

**VALIDACIÓN TERAPÉUTICA DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE
LINALOOL EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL**

ANGELA MARÍA BARRERA SANDOVAL BSc.

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
2018**

**VALIDACIÓN TERAPÉUTICA DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE
LINALOOL EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL**

ANGELA MARÍA BARRERA SANDOVAL BSc.

Tesis sometida en cumplimiento de los requisitos para la obtención del título de
Magister en:

Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Neurociencias

DIRECTOR

GLORIA PATRICIA CARDONA GOMEZ, BSc. PhD.

CO DIRECTOR

JOHANNA ANDREA GUTÉRRIZ VARGAS

COMITÉ TUTORIAL

Edison Osorio PhD.

Marisol Lamprea PhD.

Angélica María Sabogal PhD.

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

GRUPO DE NEUROCIENCIAS DE ANTIOQUIA

CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

2018

Lista de figuras

Tabla de contenido	3
Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
Lista de abreviaciones	7
CAPÍTULO I.	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
Marco conceptual	11
1. Accidente cerebrovascular	11
1.1. Caracaterísticas generales y fisiopatología	10
1.2. Epidemiología	12
1.2.1. Incidencia	12
1.3. Factores de riesgo	13
1.4. Aspectos celulares y moleculares	14
1.4.1. Excitotoxicidad	14
1.4.2. Disrupción de la barrera hematoencefálica	14
1.4.3. Respuesta inflamatoria en el accidente cerebrovascular	15
1.4.3.1. Citoquinas y moléculas pro-inflamatorias post-isquemia	17
1.4.3.2. Factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria: Papel de Nrf2 y NF-KappaB	18
1.5. Papel de las células gliales en la enfermedad cerebrovascular	20
1.5.1. Astrocitos	20
1.5.2. Microglia	21
2. Terapia con productos naturales	22
2.1. Terpenoides	22
2.2. Propiedades biológicas de los terpenoides	23
2.2.1. Actividad neuroprotectora de los terpenoides	25
2.2.2. El monoterpeno linalool y su actividad neuroprotectora	25
2.2.3. Efecto antioxidante del linalool	25
2.2.4. Efecto ansiolítico del linalool	26
2.2.5. Efecto analgésico y anti-inflamatorio del linalool	27
3. Administración intranasal	29
4. Hipótesis	32
5. Objetivos	32
6. Bibliografía	34
CAPÍTULO II	43

<i>“Microglia are the targeted population during neurological protection induced by intranasal linalool postischemia”</i>	44
<i>Abstract</i>	45
<i>Introduction</i>	46
<i>Materials and methods</i>	47
<i>Results</i>	53
<i>Discussion</i>	65
<i>References</i>	68
<i>Supplementary data</i>	75
<i>CAPÍTULO III</i>	76
<i>DISCUSIÓN GENERAL</i>	76
<i>Discusión general</i>	77
<i>Conclusiones</i>	85
<i>Perspectivas</i>	86
<i>Agradecimientos</i>	87
<i>Bibliografía</i>	88

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1. La penumbra isquémica y el núcleo isquémico.

Figura 2. Tasas de mortalidad por accidente cerebrovascular en todos los países de América Latina y el Caribe.

Figura 3. Eventos tempranos vasculares, perivasculares y del parénquima desencadenados por la isquemia - reperfusión.

Figura 4. Puntos bien caracterizados de interferencia molecular entre las vías de respuesta NF- κ B y Nrf2.

Figura 5. Administración intranasal: Rutas del transporte de fármacos desde la cavidad nasal al cerebro.

Capítulo 2

Figure 1. Intranasal linalool decreased infarct volume at 24 hours and seven days postischemia.

Figure 2. Neurological, motor and cognitive improvements were achieved by intranasal linalool after ischemia.

Figure 3. Intranasal linalool tends to reduce astrogliosis activation mainly in the hippocampus one month postischemia.

Figure 4. Intranasal linalool mainly reduced microgliosis activation in the cortex and in the hippocampus one month postischemia.

Figure 5. COX2 and astrogliosis were reduced in the hippocampus of postischemic rats.

Figure 6. Nrf2 aggregates in activated microglia and is reduced by intranasal linalool in the hippocampus of postischemic rats.

Figure 7. Linalool protects astrocytes and decrease pro-inflammatory markers under a gliotoxicity context induced by glutamate.

Figure 8. Linalool treatment caused Nrf2 microglial-specific subcellular redistribution in an anti-inflammatory environment and reduced NF- κ B, COX2 and IL1-Beta.

Supplementary figure 1. Cytokine profile after *in vivo* and *in vitro* linalool treatment.

Lista de tablas

Tabla 1. Principales mecanismos de acción neuroprotectora del linalool.

Lista de abreviaciones

- AChR:** Receptor de acetil colina (Acetylcholine receptor)
- ACV:** Accidente cerebro vascular
- ADN:** Ácido desoxiribonucleico
- ATP:** Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
- AMPA:** Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)
- APP:** Proteína precursora amiloide (Amyloid precursor protein)
- ARN:** Ácido ribonucleico
- BDNF:** Factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain derived growth factor)
- CAMs:** Moléculas de adhesión celular (cell adhesion molecules)
- CDK5:** Quinasa dependiente de ciclina 5 (Cyclin dependent of kinase 5)
- COX-2:** Ciclooxygenasa 2 (Cyclooxygenase-2)
- DAB:** Diaminobenzidina
- DMSO:** Dimethyl sulfoxide - Dimetilsulfóxido
- ECV:** Enfermedad cerebro vascular
- EEAT:** Transportadores de amino ácidos excitatorios (Excitatory amino acid transporters)
- eNOS:** Nitrógeno sintetasa endotelial (endothelial nitric oxide synthase)
- ERK:** Extracellular receptor kinase
- FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico (Fibroblast growth factor)
- GABA:** Ácido gamma aminobutírico (γ -aminobutyric acid)
- GD:** Giro dentado
- GDNF:** Factor neurotrófico derivado de células glia (Glial cell derived neurotrophic growth factor)
- GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial (Glial fibrillary acid protein)
- GLAST:** Transportador glial de alta afinidad al glutamato (glial high-affinity glutamate transporter)

GSK: Glicógeno sintetasa quinasa (Glycogen syntetase kinase)

HSP: Proteína de choque térmico (Hot shock protein).

Iba-1: Ionized calcium binding adaptor molecule

IC: Isquemia cerebral

ICAM: Molécula de adhesión intercelular (Intercelular adhesion protein)

IFN α : Interferón alpha

IL-1 β : Interlequina 1 beta

IL-6: Interlequina 6

IL-10: Interlequina 10

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible (Inducible nitrogen oxygen syntetase)

IN: Intranasal

Isq control: isquemia control (ischemia control)

Isq linalool: isquemia linalool (ischemia linalool)

I.p.: Intraperitoneal

MAP1: Proteína asociada a microtubules (Microtubules associated protein).

MCAO: Oclusión de la arteria cerebral media (medial cerebral artery occlusion)

MCH: Complejo mayor de histompatibilidad (Mayor complex immunohistocompatibility)

MMP: Metaloproteinasas de la matriz (Metaloproteinases matrix proteins)

MSC: Células madre mesenquimales (Mesechymal stem cells)

NADH: Dinucleotido adenine nicotinamide reducida (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (Nicotinamide adenine phosphate dinucleotide reduced)

NF-kB: Factor nuclear Kappa B (nuclear factor Kappa B)

NMDA: N-metil-D-aspartato (N-methyl-D-aspartate)

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal (Neuronal nitric oxid syntetase).

NO: Óxido nítrico (Nitric oxid)

NOS: Óxido nítrico sintetasa (Nitrogen oxid sintetase)

Nrf2: Factor nuclear 2 eritroide derivado

OMS: Organización Mundial de la Salud (World health organization)

PAK1: Serina/ treonina proteina quinasa (Serine/threonine-protein kinase)

PGE2: Prostaglandina E2 (Prostaglandin E)

PKA: Proteina quinasa A (Protein kinase A)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)

Sh control: Sham control

Sh linalool: Sham linalool

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutase (Superoxide dismutase)

TGF: Factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor)

tPA: Activador tisular del plasminogeno (Tissue plasminogen activator)

TRK: Tirosina quinasa (Tyrosine kinase)

UNV: Unidad neurovascular

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular endotelial growth factor)

CAPÍTULO I.
INTRODUCCIÓN GENERAL

Marco conceptual

1. Accidente cerebrovascular

1.1. Características generales y fisiopatología

El accidente cerebrovascular (ACV) se define como la disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo causado por el bloqueo de una arteria cerebral [1]. Existen dos subtipos diferentes de ACV que se encuentran determinados por las causas que los producen, las cuales pueden ser de tipo isquémico o de tipo hemorrágico; el 87% de los casos se deben a causas isquémicas. La duración de la reducción del flujo sanguíneo y la localización del infarto determina las diversas manifestaciones clínicas que se pueden presentar, entre las que se encuentran principalmente: parálisis o hemiplejía, afasia, déficit en procesos de memoria y aprendizaje, depresión y en muchos casos la muerte. El ACV es la tercera causa de muerte en el mundo y la primera de discapacidad, con una incidencia creciente en los países de ingresos bajos y medios [2]. Solo el 10% de los pacientes se recuperan por completo y la mayoría de personas afectadas por la isquemia quedan con secuelas neurológicas de por vida.

La reducción del flujo sanguíneo compromete el tejido cerebral que es irrigado por el vaso afectado. Muy pocas veces los accidentes cerebrovasculares se deben a la ausencia de flujo sanguíneo en todo el cerebro debido a un paro cardíaco. En todos los casos, los accidentes cerebrovasculares implican en última instancia la muerte y la disfunción de las células cerebrales. Se conocen dos tipos de isquemia: la global y la focal. Si se obturan vasos sanguíneos que irrigan todo o gran parte del cerebro, la lesión recibe el nombre de isquemia global, resultado del bloqueo de los principales vasos sanguíneos que suministran el cerebro anterior y dan lugar a isquemia en una gran proporción del tejido. Es común que este proceso se presente durante un ataque cardíaco o una hipotensión sistémica severa. En cambio, si sólo se produce la oclusión de vasos que irrigan una zona determinada, se genera una isquemia focal, ocluyendo un vaso específico. Generalmente la arteria cerebral media (ACM), vaso que se ve afectado en la mayoría de los accidentes cerebrovasculares isquémicos humanos afectando el tejido irrigado por este vaso [3]. En la isquemia focal, la región que sufre el grado más severo de hipoperfusión avanza rápidamente hacia un daño irreversible a causa de una muerte necrótica dando lugar al núcleo isquémico. Esta zona exhibe un bajo flujo sanguíneo cerebral (FSC) (<10% del valor basal), agotamiento de las reservas de adenosina trifosfato (ATP), y alteración irreversible del metabolismo energético [4][5]. El tejido restante hipoperfundido presenta una alteración en los mecanismos de autorregulación del flujo sanguíneo y se conoce como "zona de penumbra". En la penumbra, las neuronas muestran alteraciones de carácter funcional, aunque conservan una mínima actividad metabólica que hace que preserve su integridad

estructural durante más tiempo, siguiendo un patrón de muerte apoptótica [6,7] (Figura 1).

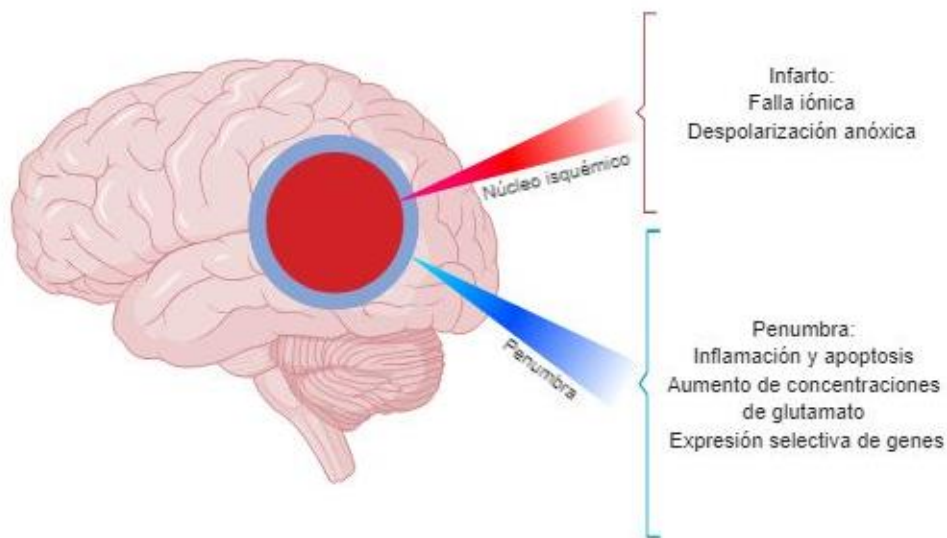


Figura 1. La penumbra isquémica y el núcleo isquémico. La penumbra es la región cerebral que sufre una baja reperusión y que rodea el "núcleo" y con alteraciones de despolarización intermitente. El núcleo y la penumbra son dinámicos en el espacio y el tiempo con diferentes umbrales de perfusión por los cuales se impiden ciertas funciones bioquímicas (escala codificada por colores). **Tomado y modificado de Dirnagl et al., 1999.**

La zona de penumbra es un área afectada pero potencialmente recuperable. Por ejemplo la reperusión tisular puede detener este proceso hasta cierto punto a medida que transcurre el tiempo; sin embargo si no se realiza un tratamiento, esta área puede empezar a verse afectada por procesos de necrosis. Por ello, recuperar la zona de penumbra puede mejorar el resultado clínico y se considera un blanco terapéutico para posibles terapias[8].

A nivel celular se presentan tres tipos de muerte inducida por la lesión isquémica cerebral y / o hipóxica: (1) necrosis, (2) apoptosis y (3) autofagia, siendo las dos primeras las más protagónicas, causadas principalmente por la excitotoxicidad glutamatérgica generada durante la lesión cerebral, desencadenando muerte celular necrótica en el núcleo isquémico. Mientras el proceso de necrosis predomina en el núcleo isquémico, la apoptosis y la autofagia ocurren en la zona de penumbra. El papel de la autofagia sigue sin estar claro, ya que puede tener diferentes roles durante la lesión cerebral isquémica, que a su vez pueden depender de la madurez cerebral, la región, la gravedad de la isquemia y el momento de las intervenciones terapéuticas.

1.2. Epidemiología

1.2.1. Incidencia

Los países en vía de desarrollo presentan incidencias muy altas de accidentes cerebrovasculares en comparación con los países desarrollados. De acuerdo a la OMS, en el 2001, el 86% de las muertes relacionadas con accidentes cerebrovasculares en todo el mundo ocurrieron en países en desarrollo. Un estudio de revisión de la incidencia de la enfermedad a nivel mundial realizado entre 1970 y 2008, muestra una disminución del 42% en la incidencia de accidentes cerebrovasculares en los países de ingresos altos y un aumento de más del 100% en la incidencia de accidentes cerebrovasculares en los países de ingresos bajos a medios [9]. Se considera que el sur de Asia es la región más contribuyente a la mortalidad por accidentes cerebrovasculares en el mundo, y probablemente representa más del 40% de todos los casos. La mayoría de estos ocurre en promedio 10 años antes que en el resto del mundo [10]. Se predice que la prevalencia del ACV en las mujeres incrementará rápidamente, debido al aumento en la edad promedio de la población femenina mundial. La prevalencia del ACV es mayor en mujeres que en hombres, debido a que los factores de riesgo también varían entre los dos géneros, pues la influencia de algunos factores como la diabetes mellitus y la fibrilación auricular, son más fuertes en las mujeres, Los trastornos hipertensivos del embarazo aumentan también el riesgo de ACV [11].

En América latina, un estudio de revisión realizado en el 2015 muestra que el accidente cerebrovascular es la principal causa de muerte en la mayoría de los países y también, una causa evidente de muerte y discapacidad [12]. Las tasas de prevalencia en estos países van desde 1,74 a 6,51 por 1000 personas y las tasas de incidencia anuales de 0,35 a 1,83 por cada 1000, siendo las lesiones ateroscleróticas intracraneales y la enfermedad de pequeños vasos mecanismos patógenos comunes subyacentes al ACV. En la mayoría de los estudios, la arteriopatía hipertensiva fue la causa más común de infartos y hemorragias [13]. El sistema de comparación de la Infobase Global de la OMS muestra que las tasas de mortalidad ajustadas por edad para el accidente cerebrovascular en 2002 fueron incluso más altas en varios países del Caribe (figura 2). Las tasas de mortalidad por accidente cerebrovascular fueron dos veces más altas en Haití y Guyana, seguido de Jamaica y Brasil, mientras que países como Colombia y México mostraron tasas más bajas [14] (Figura 2).

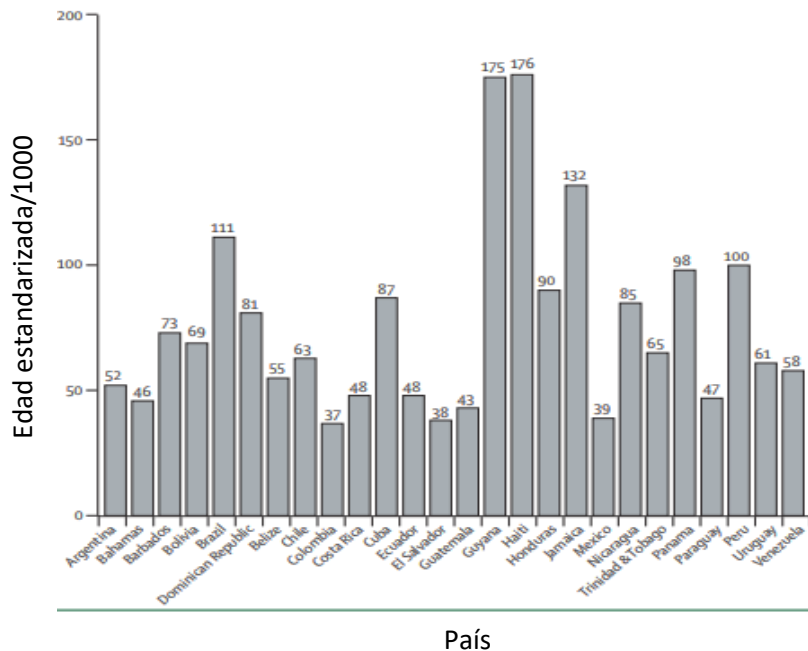


Figura 2. Tasas de mortalidad por accidente cerebrovascular en todos los países de América Latina y el Caribe en 2002. Edad estandarizada para la población mundial. Tomado de Lavados et al., 2007.

En Colombia el ACV paso de ocupar la cuarta posición de causa de muerte en 2006 [15], a la tercera en el 2016. Así, se sigue considerando al igual que en el resto del mundo una causa relevante de discapacidad con secuelas mentales, motoras y del lenguaje. Se estima que se presentan 1,31 casos de ACV / 1.000 habitantes y por ello se considera importante identificar los grupos más vulnerables para crear programas efectivos de prevención y promoción [16].

1.3. Factores de riesgo

El ACV es una enfermedad compleja cuyas causas influyentes en su desarrollo pueden atribuirse a factores ambientales, de estilo de vida y de hábitos alimenticios [17]. Hay estudios del genoma que sugieren la predisposición genética como un factor de riesgo, toda vez que estudios muestran una fuerte asociación de polimorfismos genéticos con el aumento del riesgo de ACV. Así, el riesgo de sufrir la enfermedad incidente fue un 35% mayor en pacientes con predisposición genética, y no hubo asociación entre el riesgo genético y el estilo de vida de las personas [18].

El daño vascular, la diabetes y la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, la hipertensión, la obesidad, enfermedades infecciosas e inflamación, la migraña, la enfermedad renal crónica, y la aterosclerosis afectan la salud del cerebro y por ello se consideran factores de riesgo con un impacto considerable sobre el padecimiento de la enfermedad [19–21]. Teniendo en cuenta que los hábitos de vida saludable pueden disminuir los factores mencionados, cabe destacar la importancia de adoptar una dieta saludable como la dieta mediterránea, baja en colesterol y rica en frutas y vegetales [22], práctica de ejercicio frecuente [23], abandono del hábito de fumar y consumo moderado

de alcohol [24], y el diagnóstico y manejo eficaz de la hipertensión y la diabetes [25]. Estos factores resultan componentes esenciales que pueden disminuir el riesgo de sufrir un ACV.

1.4. Aspectos celulares y moleculares

1.4.1. Excitotoxicidad

El cambio en el flujo sanguíneo cerebral restringe la disponibilidad de sustratos, particularmente oxígeno y glucosa. Con ello, el deterioro generado durante el ataque produce varios eventos excitotóxicos y fallas de energía que alteran el parénquima cerebral [4]. La muerte celular generada después de la isquemia es inmediata, se observa entre 5 y 10 minutos después de la oclusión. El agotamiento de energía celular generado debido a la falla mitocondrial incrementa la apoptosis, también hay pérdida de potasio y ATP, que son esenciales para el metabolismo energético. Se presenta también una afectación del gradiente de iones de sodio, cloruro, y de calcio que tiene efectos severos sobre la funcionalidad de la membrana celular. La liberación descontrolada de neurotransmisores excitatorios como el glutamato en áreas isquémicas, media la transmisión sináptica excitotóxica a través de la activación de los receptores *N*-metil-d-aspartato (NMDA) aumentando el influjo de Na^+ y Ca^{2+} , produciendo severos efectos sobre la membrana neuronal. Debido al déficit de ATP y al desequilibrio del flujo del Ca^{2+} , se activan señales enzimáticas mediadas por proteasas, lipasas y nucleasas, favoreciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Todas estas reacciones generan alteraciones en la homeostasis celular y en la plasticidad neural [5].

1.4.2. Disrupción de la barrera hematoencefálica

Las metaloproteínas activas producto del desequilibrio iónico y los fenómenos de excitotoxicidad, causan alteraciones de la barrera hematoencefálica (BBB) y la unidad neurovascular (NVU) que está conformada por neuronas, microglía, astrocitos, pericitos y células endoteliales que recubren la red capilar cerebrovascular. La BBB ha sido descrita como el guardián del sistema nervioso central (CNS), manteniendo la frágil homeostasis del cerebro. Sus componentes trabajan en conjunto para regular la permeabilidad microvascular, los gradientes iónicos, la absorción de nutrientes, la eliminación de toxinas, y la hemodinámica cerebral [26]. Cuando cualquiera de los componentes individuales se altera, se produce una disfunción de la BBB y se afecta el parénquima cerebral [27] (figura 3).

Las uniones estrechas y adherentes de las células endoteliales son la estructura más apical del espacio intercelular y su función es limitar el flujo de moléculas a través de la BBB [26]. Dentro de las dos horas siguientes de presentarse una isquemia, la BBB se vuelve más permeable. Este aumento de la permeabilidad

tiene efectos graves, especialmente después de la reperfusión, porque genera un ambiente citotóxico, infiltración de células inmunitarias e inflamatorias, aumento de citoquinas pro inflamatorias y especies oxidativas potencialmente tóxicas, las cuales contribuyen a inducir daños secundarios en la zona de penumbra [28]. La BBB parece abrirse y cerrarse repetidamente después de un ACV isquémico [28]. El período de apertura final se asocia con un aumento de la permeabilidad celular debido a la ruptura de proteínas de unión estrecha como la claudina-5 y otras integrinas [29,30].

1.4.3. Respuesta inflamatoria en el accidente cerebrovascular

Uno de los mecanismos de respuesta tisular al evento isquémico es la inflamación, caracterizada por la expresión de citoquinas pro inflamatorias, moléculas de adhesión y otros mediadores, incluidos los prostanoïdes y el óxido nítrico [31]. La inflamación es progresiva durante los días siguientes al inicio de los síntomas y tiene un papel importante en el incremento del deterioro neurológico y durante las etapas tardías de la lesión isquémica.

Las consecuencias moleculares de la isquemia cerebral incluyen cambios temporales en la señalización celular, la transducción de señales, la regulación del metabolismo y la expresión de genes. La inflamación produce alteraciones tanto a nivel molecular como celular [31]. La respuesta inflamatoria post-isquémica tiene lugar a partir de una secuencia de eventos ordenados, el proceso comienza cuando la hipoxia resultante, y la producción de ROS desencadenan la activación del complemento, las plaquetas y células endoteliales [27]. Luego, la molécula de adhesión P-selectina se transloca a la superficie de la membrana de plaquetas y células endoteliales, dando lugar al inicio de las señales pro-inflamatorias y a la producción de ROS. Además, del estrés oxidativo, las señales de inflamación alteran la permeabilidad de la BBB. Las proteasas son liberadas por los astrocitos y las células vasculares. La desgranulación de los mastocitos libera mediadores como histamina, proteasas y factor de necrosis tumoral (TNF), mientras que los macrófagos en su estado activo liberan citoquinas pro-inflamatorias contribuyendo al daño de la BBB y favorece la infiltración de leucocitos (figura 3).

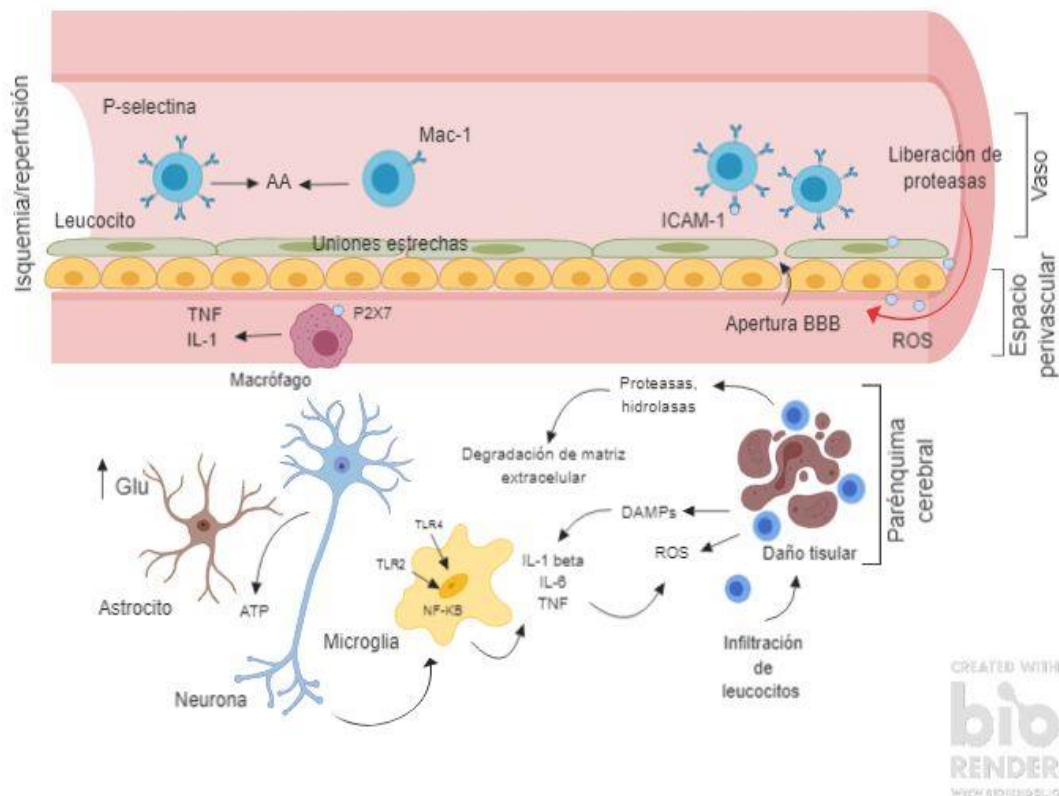


Figura 3. Eventos tempranos vasculares, perivasculares y del parénquima desencadenados por la isquemia - reperfundión. La hipoxia, las ROS y los cambios homeostáticos inician una serie de eventos celulares inducidos por isquemia y reperfundión. En el lumen de los vasos, la isquemia y la reperfundión conducen a la coagulación sanguínea, la agregación plaquetaria y el aumento de liberación de citoquinas. (IL-1 α). La translocación de P-selectina en la superficie de las plaquetas y las células endoteliales conduce a la agregación plaquetaria. Se activa el complemento, y se liberan metabolitos del ácido araquidónico (AA). En la pared vascular, la regulación positiva de E y P-selectina en las células endoteliales proporciona una plataforma para la unión de los leucocitos a través de la interacción con glicoproteínas, por ejemplo, el ligando-1 de glicoproteína P-selectina. Una firme adhesión se obtiene después de la expresión endotelial de ICAM-1 que interactúa con las integrinas de leucocitos B2 (LFA-1 y Mac-1). La pérdida de NO promueve la vasoconstricción y mejora la agregación de leucocitos y plaquetas. La activación de MMP podría conducir a la degradación de la BBB y a la proteólisis de la matriz, facilitando la extravasación de leucocitos. En el espacio perivascular, las subunidades del complemento quimiotáctico (C5a) actúan sobre los receptores del complemento de los mastocitos (CD88) y conduce a la desgranulación y liberación de Histamina y proteasas, contribuyendo a la filtración de la BBB. Las citoquinas (TNF α , IL-1 β) son producidas por mastocitos y macrófagos perivasculares, proporcionando más señales para guiar la migración de leucocitos a través de la pared del vaso. En el parénquima cerebral, las células lesionadas liberan purinas (ATP), que actúan como señales proinflamatorias tempranas que conducen a la producción de citoquinas y quimiocinas. Hay una Interrupción de la interacción neuronal-microglia (CX3CL1, CD200). El glutamato (Glu) extracelular que actúa sobre el receptor

metabotrópico microglial GluR1 27 también contribuye al medio proinflamatorio. Tomado y adaptado de Ladecola & Alrather 2011.

1.4.3.1. Citoquinas y moléculas pro-inflamatorias post-isquemia

Las citoquinas representan una familia de polipéptidos pleiotrópicos (8-26 kDa) que regulan la activación, proliferación y diferenciación celular, y que se encuentran en muy bajas concentraciones en el cerebro [32]. Después de una lesión cerebral, las citoquinas pro y anti-inflamatorias se regulan de forma rápida. Sin embargo, las citoquinas pro-inflamatorias estimulan y agravan la respuesta inflamatoria. Las más protagónicas después de un ACV son la IL-1 β [33,34], el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la IL-6 (27). La liberación de estas citoquinas induce la síntesis de varios mediadores corriente abajo como la prostaglandina (PG) -E2 y el óxido nítrico [35]. Por su parte, las citoquinas anti-inflamatorias inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y reducen la inflamación. A este grupo pertenece el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la IL-10. Así, el equilibrio entre los efectos perjudiciales y beneficiosos de las citoquinas depende del contexto fisiológico y bioquímico en el cerebro [36].

Se ha descrito que la actividad de la IL-1 β inicia una (1) hora después de la reperfusión [37]. La microglia activada representa la mayor población celular implicada en la producción temprana de IL-1 β , seguida por los astrocitos, las neuronas y las células endoteliales. Se ha reportado la actividad de esta citoquina en la función cerebral post-isquemia incrementando la entrada de calcio a las neuronas y exacerbando la muerte neuronal. También está relacionada con la inducción de la activación de astrocitos y microglia, que inicialmente tiene un papel protector, pero que de mantenerse en el tiempo puede tener consecuencias en la dificultad de resolución del fenómeno patológico, esta molécula puede inducir edemas y favorecer la adhesión de leucocitos [36].

TNF- α es una adipocina pro-inflamatoria asociada con la inmunidad innata y las reacciones de fase aguda, en condiciones normales tiene un papel neuroprotector, cuando su producción se vuelve excesiva esta citoquina es asociada con disfunción cerebral y patologías [27]. La Interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina secretada por células T, macrófagos y en menores proporciones en astrocitos, microglia y neuronas y tiene un papel reconocido en las respuestas adaptativas de células vasculares; en la función cerebral se ha descrito su función en procesos de neurodesarrollo y diferenciación, pero en un contexto patológico como el infarto cerebral, esta citoquina es responsable de las respuestas de fase aguda y de afectación del tejido [38].

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) pertenece a un grupo de enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, se expresa constitutivamente en neuronas excitatorias, su expresión esta mediada por varios estímulos, entre

ellos los inflamatorios, se ha reportado que su función en un contexto patológico y de inflamación los productos de la actividad de COX-2 está relacionada con la producción de ROS y con procesos de citotoxicidad y sus niveles de expresión aumentan considerablemente después de una isquemia cerebral [39].

1.4.3.2. Factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria: Papel de Nrf2 y NF-KappaB

El factor de transcripción NF_{kappa}B (NF-κB), tuvo inicialmente una función descrita solo para células B, pero se ha demostrado que está implicado en muchas funciones celulares; sin embargo, se ha descrito que cuando su expresión aumenta en células gliales, es un indicador de respuesta inflamatoria exacerbada, e induce la expresión de varios genes inflamatorios. Además, el NF-κB juega un papel crítico en la regulación de la supervivencia, activación y diferenciación de las células inmunes innatas y las células T inflamatorias. En consecuencia, la activación desregulada de NF-κB contribuye a los procesos patógenos de varias enfermedades inflamatorias.

La activación de NF-κB involucra una vía canónica y otra no canónica, ambas importantes para regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias. El principal mecanismo para la activación canónica de NF-κB es la degradación inducible de IκBα desencadenada a través de su fosforilación específica por un quinasa (IKK) que se puede activar por diferentes señales como las citoquinas, factores de crecimiento, componentes microbianos y agentes de estrés, cuando se fosforila desencadena la degradación de IκBα dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma, lo que resulta en una translocación nuclear rápida y transitoria de los miembros canónicos de NF-κB p50 / RelA y p50 / c-Rel. La activación no canónica de NF-κB involucra a la quinasa inductora (NIK), un miembro de la familia MAP quinasa, que activa IKKα y da como resultado la translocación de los heterodímeros RelB / p52 NF-κB al núcleo.

En un contexto de accidente cerebrovascular isquémico se ha reportado un incremento en la actividad del factor de transcripción NF-κB y su acción como activador de genes pro inflamatorios [40–42]. La señalización de NF-κB juega un papel protagónico en la propagación de las señales inflamatorias en varias[43,44] ; por lo tanto, hay muchas estrategias terapéuticas para enfermedades inflamatorias dirigidas a bloquear la actividad este factor de transcripción.

Por otro lado, el Factor nuclear 2 eritroide derivado (Nrf2) es un factor de transcripción que modula las respuestas antioxidantes celulares, pertenece a una familia de proteínas que se caracteriza por la presencia de un dominio de dimerización conservado de la región básica leucina. En condiciones basales Nrf2 permanece en el citoplasma asociado con el citoesqueleto de actina a través

de KEAP1, en donde bajo condiciones no estresadas se degrada rápidamente. KEAP1 funciona como un adaptador para la ligasa E3 en el citoplasma, donde se dirige a Nrf2 para la degradación proteasomal mediada por ubiquitinización. En presencia de inductores de ARE, se suprime la interacción Nrf2-KEAP1, y Nrf2 se transloca al núcleo, donde se dimeriza con pequeñas proteínas Maf para aumentar la tasa de transcripción de los genes con actividad antioxidante. En contextos patológicos se ha descrito protección generada a través del aumento de la transcripción de genes antioxidantes mediada por Nrf2, por ejemplo, el efecto protector generado frente a la enfermedad renal [45], disminución de la permeabilidad de la barrera retinal después de la activación inducida de Nrf2 [46]. En cuanto a la función neurológica, tBHQ, un inductor de la actividad Nrf2, reduce el daño cortical y el déficit sensoriomotor a las 24 horas e incluso 1 mes después de la generada la isquemia en ratas [47]. En modelos *in vitro* de cultivos de astrocitos y microglia se ha descrito la activación de Nrf2 para mediar la respuesta antioxidante después de la inducción de ROS [48].

Después del evento isquémico el control de la respuesta inflamatoria y oxidante se vuelve clave a la hora de buscar tratamientos efectivos para la enfermedad [36,49]. Hay estudios Farmacológicos y genéticos que sugieren una interacción entre estas dos vías y la actividad moduladora de los factores de transcripción Nrf2 y NF-κB sobre estos mecanismos [50] (figura 4). NF-κB puede modular la transcripción y la actividad de Nrf2 con efectos tanto positivos como negativos sobre los genes diana. El estudio de la asociación de estos dos factores de transcripción surgió a partir del aumento en la producción de citoquinas en ratones knock-out para Nrf2. Igualmente la actividad de NF-κB se ve aumentada en ambientes pro-oxidantes y su interacción se debe a interacciones moleculares complejas que pueden variar entre células y tejidos [51].

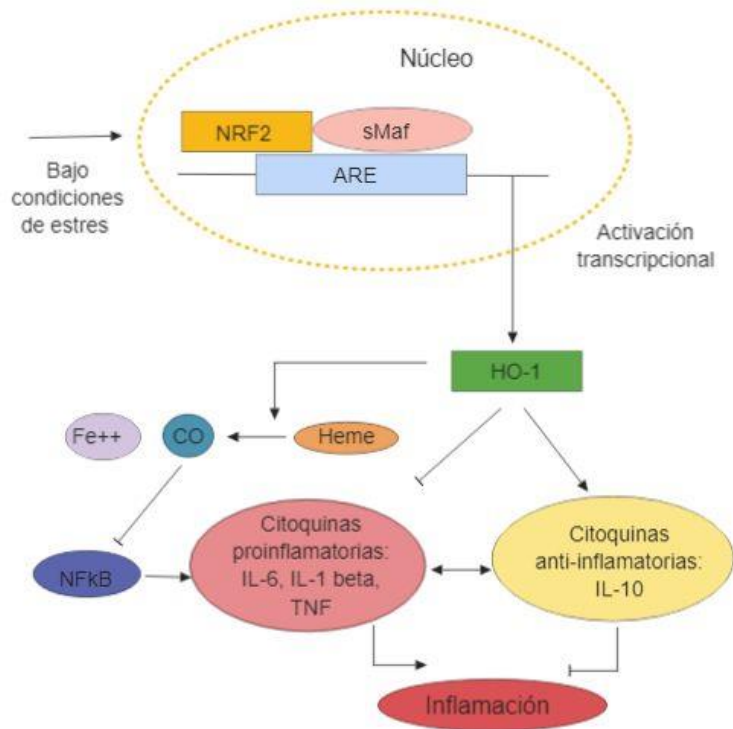


Figura 4. Puntos de interacción molecular entre las vías de respuesta NF-κB y Nrf2. Tomado de S.Ahmed et al., 2017.

1.5. Papel de las células gliales en la enfermedad cerebrovascular

1.5.1. Astrocitos

Los astrocitos son células especializadas que están implicadas en muchas funciones de homeostasis celular, controlan las señales glutamatergicas y las concentraciones de glutamato en el ambiente extracelular. Los astrocitos son menos sensibles que las neuronas al daño isquémico, tienen menor densidad de receptores ionotrópicos de glutamato en comparación con las neuronas, característica que los hace más resistentes al desbalance iónico a los fenómenos excitotóxicos, debido en parte a su mayor capacidad antioxidante y a su participación en la regulación del calcio [53]. Los procesos astrocíticos están en contacto con cada sinapsis y los pies terminales de las células forman la capa interna de la barrera BBB, propiedad que les permite reaccionar a los cambios locales en la actividad neuronal, responder a las perturbaciones sistémicas y actuar como barrera física y molecular para mantener su integridad. Proporcionan apoyo trófico y funcional a las neuronas mediante el transporte de glucosa y la liberación de factores neurotróficos. Además, los astrocitos pueden detectar señales de daño neuronal e inflamación para regular la respuesta neuroinflamatoria, también están implicados en la formación de la cicatriz glial que ayuda a recuperar la lesión isquémica [54].

Después de un evento isquémico se presenta una respuesta por parte de los astrocitos conocida como astrogliosis reactiva que incluye cambios morfológicos, de proliferación y de expresión génica en las células reactivas. Morfológicamente, los astrocitos se agrupan en dos tipos: astrocitos fibrosos y protoplásmicos, los primeros están muy ramificados, mientras que los protoplásmicos tienen procesos más gruesos y en menor cantidad. La heterogeneidad morfológica y funcional de los astrocitos está relacionada con el papel fisiológico y patológico que desempeñan los astrocitos en el SNC [55]. En un contexto patológico los astrocitos reactivos se vuelven hipertróficos (astrogliosis reactiva) con una morfología característica menos ramificada y con un aumento en la expresión de la proteína fibrilar glial (GFAP), cambio que se observa fácilmente en tiempos agudos de la lesión isquémica y con un mayor número de células hiperreactivas cerca al núcleo de la lesión y en la zona de penumbra del hemisferio que ha sido afectado por la isquemia [56].

El papel protagónico de la población astrogliar por sus importantes funciones frente al daño isquémico y los diversos mecanismos e interacciones subyacentes a la enfermedad, convierten a estas células en un blanco de estudio que puede proporcionar información valiosa sobre potenciales terapias.

1.5.2. Microglia

Las células microgliales son los macrófagos residentes o de origen mieloide del sistema nervioso central, se caracterizan por una típica morfología ramificada que puede hacerse más ameboide en un estado de reactividad [57]. Durante procesos de lesión del SNC, la microglia se encarga de fagocitar y eliminar microorganismos, células muertas y agregados de proteícos, estas células también secretan factores solubles, quimioatrayentes, citoquinas y factores neurotróficos implicados en la respuesta inmune y la reparación de tejido en el SNC. Son células muy dinámicas capaces de extender sus ramificaciones para generar una respuesta inmune en el tejido, se conectan con las neuronas, los astrocitos y los vasos sanguíneos, también participa en la sinapsis [58].

Durante un estímulo inflamatorio la microglía es la primera población celular en responder, adoptando un fenotipo ameboide, con una forma aumentada en tamaño y con ramificaciones más cortas asociadas con la fagocitosis y la función pro-inflamatoria. Por lo tanto, la forma y el movimiento de la microglía refleja sus respuestas a una amplia gama de estímulos que van desde la actividad neuronal normal a insultos físicos, químicos y microbianos, exhibiendo plasticidad tanto fenotípica como funcional en condiciones basales y patológicas [59]. Los fenotipos microgliales se han caracterizado con respecto a la presencia de moléculas particulares de la superficie celular y a la expresión de citoquinas específicas: el fenotipo “M1 like” (pro-inflamatorio y neurotóxico) y el fenotipo “M2

like” (anti-inflamatorio), sin embargo, esta caracterización no es del todo clara y necesita más estudios para ser mejor comprendida [60].

Los procesos inflamatorios tienen un papel fundamental en la fisiopatología del accidente cerebrovascular y con ello la activación microglial debido a las señales excitotóxicas generadas. Una vez activada la microglia da inicio a la fagocitosis, a la producción de citoquinas y a la activación de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) que debilitan la barrera hematoencefálica dando como resultado la infiltración de leucocitos que exacerban la inflamación y el daño cerebral [61].

2. Terapia con productos naturales

2.1. Terpenoides

Los terpenos también conocidos como terpenoides o isoprenoides constituyen una clase importante de moléculas orgánicas producidas por diversos organismos, para llevar a cabo una variedad de funciones biológicas en diferentes contextos ecológicos [62]. Los terpenoides constituyen la mayor familia de productos naturales, con más de 40.000 compuestos individuales descritos [63] y juegan diversos papeles funcionales en las plantas, dentro de los se destacan: actividad hormonal, pigmentación fotosintética, transportadores de electrones y funciones estructurales como los fitoesteroles, componentes de las membranas, entre otras. Además de estas funciones fisiológicas, cumplen también funciones sobre la defensa de las plantas, llevadas a cabo por fitotoxinas relacionadas con la prevención frente a herbívoros [64]. Los terpenoides se encuentran disponibles en cantidades relativamente grandes como componentes de aceites esenciales, resinas y ceras que ofrecen una gama de productos útiles y comerciales, pero sobre todo, una amplia gama de este grupo de fitoquímicos ha sido utilizada por sus propiedades farmacéuticas. La diversidad química de los terpenoides es probablemente una de las razones de su reconocida actividad biológica, lo cual los ha convertido en moléculas de gran interés para la comunidad científica. Por ejemplo, como productos farmacéuticos, saborizantes, aromatizantes, complementos alimenticios en forma de vitaminas o edulcorantes [64].

Las funciones biológicas de los terpenos han tenido efectos benéficos sobre otros organismos diferentes a sus productores, propiedades atribuidas a los procesos de coevolución que han permitido la adaptación de las especies en el planeta; dentro de esos organismos encontramos a los seres humanos. Gracias a las investigaciones realizadas sobre la determinación de las propiedades biológicas de los terpenoides, ha sido posible concluir que estas moléculas poseen una potente actividad biológica y por ello, reconocidos fármacos pertenecen a este grupo de moléculas. Dentro de los principios activos más utilizados de origen terpenoide encontramos esteroides, tocoferoles, taxanos, la artemisinina, y los cannabinoides [62].

Los terpenoides son en gran medida responsables de la fragancia característica de muchas plantas. Varios monoterpenos componentes de la dieta han mostrado actividad antitumoral y son eficaces en la quimiopreención y la quimioterapia para el cáncer [65]. Además, los aceites esenciales y sus derivados (terpenos) también han demostrado propiedades antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, antivirales, anti-alergénicos, anti-inflamatorias y neuroprotectora [66]. Estas sustancias son generalmente obtenidas a través de métodos tradicionales de extracción a partir de plantas o de síntesis química [67]. Estas características convierten a los terpenoides en potenciales blancos farmacológicos para el tratamiento de diversas patologías dentro de las que encontramos el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. Estas últimas han generado gran interés en los últimos años debido a su creciente incidencia sobre la población. La presente revisión muestra un panorama general de la acción de los terpenoides enfocado en los monoterpenos, particularmente en el linalool y su potencial acción neuroprotectora.

2.2. Propiedades biológicas de los terpenoides

Debido a la variada estructura química de los terpenoides, se han atribuido diferentes propiedades de acción biológica, dentro de las que encontramos su efecto anticancerígeno. Varios fitoquímicos de origen natural han mostrado un enorme potencial en la prevención y el tratamiento de varios tipos de cáncer, especialmente los de los sistemas gastrointestinal [68], mostrando eficacia sobre esta patología en estudios preclínicos con modelos animales a través de experimentos *in vitro* e *in vivo* para evaluar los mecanismos celulares y moleculares relacionados con su efectividad. El tratamiento con un extracto destilado de jengibre (SDGE) mostró ser un potente inhibidor de la proliferación de células de cáncer de endometrio. El SDGE aumentó los niveles de calcio intracelular y una disminuyó el potencial de membrana mitocondrial, el tratamiento mostró un aumento de la proteína p53 que se asoció con una disminución del 90% de Bcl2, induciendo los efectos anticancerígenos de la apoptosis. Demostrando que los terpenoides de SDGE median la apoptosis mediante la activación de p53 [69].

Los estudios ubican a los monoterpenos como moléculas útiles en terapias preventivas contra el cáncer de mama, piel, pulmón, colón, páncreas y próstata, [69–71], en particular el d-limoneno, la cucurbitacina B, el ácido ursólico, el β -caroteno y el licopeno. Otra de las acciones bastante conocidas de los terpenoides es la relacionada con su actividad antiparasitaria. Un estudio demostró la actividad de limoneno sobre especies de *Leishmania* evaluada en modelos *in vitro* e *in vivo*, donde el tratamiento con limoneno reveló mediante exámen histopatológico una disminución significativa en la carga parasitaria de las lesiones tratadas tópicamente con limoneno; esta molécula presenta baja toxicidad en los seres humanos y ha demostrado ser un agente eficaz en la mejoría de la penetración percutánea de fármacos [72]

Un extracto de *Artemisia pasiflora* caracterizado por su alto contenido de terpenoides y otros compuestos mostró una fuerte inhibición del crecimiento de las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. flexneri*. Las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del extracto fueron atribuidas a los metabolitos secundarios: terpenos y compuestos fenólicos presentes en *A. Parviflora*, ya que el crecimiento de *P. aeruginosa* fue inhibida por el extracto comparado con otros antibióticos utilizados normalmente [73].

Los terpenoides son unos de los agentes antimicrobiano activos más abundante aislados de las plantas [74]. Esta capacidad antibacteriana es principalmente dependiente de la interacción con la membrana celular de los microorganismos, ya que los terpenoides interactúan con los componentes lipídicos de las membranas celulares, penetran fácilmente en el interior de la célula y tienen interacción con el material intracelular [75].

Las propiedades biológicas antes mencionadas de los terpenoides han sido atribuidas a características propias de estas moléculas, como su particular capacidad para interactuar con la bicapa lipídica de las células. Un estudio por espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) demostró que las moléculas de terpeno actúan como separadores de lípidos, lo que lleva a un aumento de la población de los componentes más móviles. Por lo tanto, la inserción de terpenos aumenta la fluidez de la bicapa lipídica, y de esta forma los terpenos pueden actuar moderando los coeficientes de reparto de la membrana entre el agua y terpenos formando estructuras micelares altamente hidrofóbicos que son lo suficientemente dinámicas para competir por los lípidos de membrana, característica que podría explicar su acción potenciadora de la permeabilización de la piel, y por tanto tener actividad antiparasitaria y antineoplásica debida probablemente a sus efectos sobre el componente lipídico de la membrana celular [76]. Otra propiedad de los terpenos es su potencial antioxidante y sus efectos sobre la disfunción mitocondrial. Un estudio en el que se evaluó la eficacia preventiva de una combinación de terpenos para reducir la hepatotoxicidad inducida en un modelo de roedores, ya que el mecanismo subyacente a esta hepatotoxicidad está mediado por las mitocondrias, al acelerar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el consecuente estrés oxidativo [77]. Los fitoquímicos, canfenol y geraniol mostraron capacidad antioxidante significativa y un efecto citoprotector contra el estrés oxidativo inducido, evitando el desequilibrio redox, ayudando a prevenir el deterioro del flujo de electrones e impidiendo la escisión de la procaspasa-9 y la procaspasa-3 en su forma activa, que a su vez, pone un freno al posterior daño en el ADN [78].

2.2.1. Actividad neuroprotectora de los terpenoides

El efecto antioxidante y de interacción celular de los terpenoides, les confieren muchas propiedades, dentro de las que encontramos su acción neuroprotectora atribuida a su efecto sobre trastornos neurológicos y neurodegenerativas, tales como el accidente cerebrovascular, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson [79]. Dentro de estos encontramos por ejemplo la oridonina, un diterpeno que redujo la pérdida sináptica, atenuó las alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas y la estructura de las neuronas del hipocampo de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer, además de otros estudios *in vivo* e *in vitro* [79]. Además se han descrito estudios sobre el aumento de la actividad mitocondrial promovida en los sinaptosomas de ratones enfermos [80]. En modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, el monoterpeno linalool redujo los marcadores histopatológicos de la enfermedad, revirtió el deterioro cognitivo y ejerció un efecto ansiolítico, también disminuyó el deterioro motor y neurológico después del infarto cerebral [81,82]. Se han descrito también otros compuestos de origen terpenoide como el cannabidiol, el carvacrol, el delta-9-tetrahidrocannabinol, el catalpol y el licopeno, los cuales han mostrado efectos protectores contra la neurotoxicidad isquémica y glutamatérgica, el estrés oxidativo, tanto en sistemas celulares *in vitro* e *in vivo* [83–85]. También se ha descrito la actividad de estas moléculas sobre vías de señalización antioxidantes como la potente activación de la vía Nrf2/ARE sugiriendo que los terpenoides pueden ser beneficiosos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington [83].

2.2.2. El monoterpeno linalool y su actividad neuroprotectora

Dentro de las propiedades moduladoras de la funcionalidad neurológica del linalool, encontramos su efecto anti-nociceptivo del linalool en diferentes modelos de inducción con ácido acético [86], modulación de la respuesta de tolerancia a la morfina a través de la inhibición de los receptores de NMDA. El linalool tiene propiedades como antagonista de los receptores NMDA que juegan un papel clave en los procesos de aprendizaje y memoria, mejorando los procesos de adquisición en ratas [87].

2.2.3. Efecto antioxidante del linalool

Las propiedades antioxidantes del linalool han sido mencionadas en varios estudios. La administración intraperitoneal de linalool en ratas Wistar tratadas con acrilamida mostró efectos protectores contra la neurotoxicidad inducida por la acrilamida, elevando los niveles de glutatión (GSH) y la reduciendo de la peroxidación lipídica en la corteza cerebral. Un estudio con hojas de laurel de la india cuya composición es rica en contenido de linalool, evaluó la capacidad antioxidante y la eliminación de radicales libres a partir del extracto fenólico de la planta en un modelo *in vitro* mostrando una inhibición de la peroxidación lipídica, atribuyendo los efectos positivos de la hoja de laurel a la presencia de fitoquímicos antioxidantes en la planta en el modelo *in vitro* [88]. Además, un

estudio en pacientes con síndrome del túnel carpiano, enfermedad en la que se genera una elevada presión del nervio medio de la muñeca y donde especies reactivas de oxígeno contribuyen al aumento de la lesión tisular, y por lo tanto aseveran la condición. Se encontró que los niveles de estrés oxidativo y la actividad antioxidante de los pacientes a los que se les administró linalool por vía intranasal, mejoraron significativamente, sugiriendo a esta molécula como candidato terapéutico para el tratamiento de síndrome del túnel carpiano por su actividad antioxidante [89]

En un estudio *in vitro* la exposición de células a la estimulación con LPS mostró que el linalool redujo la acumulación de nitritos e inhibió significativamente la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que sugirió que la actividad inhibidora del linalool se debe principalmente a la actividad de la enzima iNOS, y que la reducción del óxido nítrico (NO) Producción / liberación es dependiente, al menos parcialmente, de los mecanismos moleculares de los efectos del Linalool probablemente a través de los mecanismos en los que intervienen los sistemas colinérgicos y glutamatérgicos [90].

2.2.4. Efecto ansiolítico del linalool

Dentro de las propiedades de los terpenos encontramos también su potencial efecto ansiolítico y antidepresivo. Estudios realizados a partir de plantas ricas en contenido de linalool muestran que esta molécula presente en las hojas de *C. osmophloeum* puede aumentar de forma significativa el tiempo de permanencia en la zona central del campo abierto y en los brazos abiertos de la prueba laberinto en cruz elevado, sin producir efectos secundarios que afecten la actividad motora, indicando una excelente respuesta ansiolítica, sumado a los resultados de las mediciones de las monoaminas cerebrales en los ratones tratados, revelando una disminución en las concentraciones de serotonina, dopamina y la norepinefrina; dicho efectos se han, atribuido a su principal compuesto, (+) – linalool [88]. Otra investigación donde se administró óxido de linalool inhalado en ratones mostró que el linalool aumentó significativamente el número de visitas a los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado y el tiempo de permanencia en este. También, en la prueba de la caja de luz / oscuridad, la inhalación de óxido de linalool produjo un aumento en el tiempo de permanencia de los ratones en la cámara brillante y el número de cruces, revelando una vez más sus propiedades ansiolíticas en modelos animales, sin causar ningún déficit motor [91].

Los efectos ansiolíticos del linalool inhalado han sido descritos también en la disminución del comportamiento agresivo en ratones, ya que el linalool evidenció propiedades ansiolíticas en la prueba de luz / oscuridad, disminuyendo la interacción social y el comportamiento agresivo; fortaleciendo la sugerencia de que la inhalación de aceites esenciales ricos en linalool puede ser útil para contrarrestar la ansiedad [92].

Los efectos ansiolíticos antes mencionados del linalool han sido atribuidos principalmente a sus propiedades volátiles y a sus características olfativas [93], estudios han demostrado que los compuestos aromáticos con aroma a lavanda pueden mejorar el sueño en los ancianos y lactantes tras estas evidencias, el linalool ha demostrado que no sólo activa los receptores olfativos para modular potencialmente a los receptores de los canales iónicos, como canales de receptores transitorios (TRP), sino que también potencia los receptores (GABA) en el sistema nervioso central [94]. Este sistema de receptores ha demostrado estar implicado en la capacidad sedante, ansiolítica y de procesos calmantes. Basados en los estudios acerca del linalool puede inferirse que juega un papel en la respuesta tranquilizante en los seres humanos, estudios experimentales en ratas utilizando linalool marcado con carbono 14 demostró que se absorbe rápidamente en el tracto intestinal después de la administración oral. La mayor parte de linalool se metaboliza en el hígado y se excreta principalmente en la orina, después de 20 días de administrado el linalool se detectaron los metabolitos 8-Hydroxylinalool y 8-carboxylinalool en ratas [95].

2.2.5. Efecto analgésico y anti-inflamatorio del linalool

En cuanto a las propiedades analgésicas y anti-inflamatorias del linalool se han estudiado aceites esenciales de plantas con alto contenido del monoterpeno, como es el caso de *Zhumeria majdae*, con el cual se evaluó la actividad analgésica del aceite mediante la prueba con ácido acético y la prueba de placas calientes de Eddy, el efecto anti-inflamatorio agudo fue investigado a través de la prueba de edema de la pata en ratas, donde los animales tratados con el aceite esencial, se redujo significativamente el número de contorsiones inducidas por el ácido acético, y se disminuyó el edema, actividad atribuida los principales componentes del aceite, como son: linalool (63,4%) y alcanfor (27,5%) [96]. Otra especie vegetal con alto contenido de linalool es *Citrus aurantium L*, de la cual se estudió su efecto analgésico y anti-inflamatorio a partir del aceite esencial de los flores evaluado en roedores, el aceite esencial redujo significativamente el número de retorcimientos inducidos por el ácido acético en ratones, además, exhibió un efecto analgésico central, como lo demuestra un aumento significativo en el tiempo de reacción en el método de la placa caliente, mostró también reducción de la inflamación. Los componentes principales de la especie son el linalool (28,5%), junto con otros terpenoides que podrían ser responsables de las actividades observadas. Los resultados sugieren que los aceites esenciales ricos en monoterpenos poseen formas biológicamente activas contra la inflamación aguda y crónica sumado a sus efectos antinociceptivo [97]. El resumen de todos los efectos neuroprotectores reportados para el linalool se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Principales mecanismos de acción neuroprotectora del linalool

Efecto	Mecanismo	Referencia
Efecto antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Elevación de los niveles de glutatión (GSH) • Reducción de la peroxidación lipídica • Eliminación de radicales libres • Reducción la acumulación de nitritos • Inhibición de la expresión de óxido sintasa nítrico inducible (iNOS), 	[92,98–100]
Efecto ansiolítico	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en las concentraciones de monoaminas cerebrales (serotonina, dopamina y norepinefrina) • Aumenta la permanencia en los brazos abiertos en pruebas de laberinto en cruz elevado en roedores. • Aumenta la permanencia en el centro del montaje de la pruebas campo abierto en roedores. • Disminuye el comportamiento agresivo en roedores. 	[88,91,101]

Efecto analgésico y anti-inflamatorio	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto antinociceptivo en roedores. • Disminuye el edema en roedores. 	[102,103]
Dismutación de la neurodegeneración	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la agregación de la proteína Betamiloide 	[80,104,105]

3. Administración intranasal

Uno de los principales objetivos de la búsqueda de nuevos tratamientos para el infarto cerebral es garantizar la entrega de agentes activos o fármacos al cerebro, a través de métodos lo menos invasivos posible [106]. Las vías tradicionales de administración sistémica, no aseguran la llegada de los niveles cerebrales necesarios para generar un tratamiento efectivo. Por ello, se han estudiado otras vías de administración, como la intranasal que tiene acceso directo al cerebro y es menos invasiva, considerándose una ruta prometedora para la entrega de fármacos al sistema nervioso [107]

Aunque actualmente la administración intranasal se utiliza principalmente para la administración sistémica de fármacos, las células nerviosas olfativas de las mucosas nasales están en contacto directo con el cerebro y la médula espinal. Esta conexión única se ha investigado para administrar agentes terapéuticos porque es una ruta de administración no invasiva y aceptable para múltiples sustancias, además de evitar el metabolismo hepático de primer paso y la barrera hematoencefálica [108,109]. Si bien, los mecanismos implicados en la administración intranasal de fármacos al cerebro todavía están siendo dilucidados, algunas de las vías involucradas sugeridas son: el mecanismo intracelular que incluye la absorción en las neuronas sensoriales olfativas dentro de la cavidad nasal a través de la difusión y la endocitosis. Sin embargo, el transporte intracelular es un proceso lento; por otro lado, el transporte extracelular, es más rápido y probablemente representa en gran parte la rápida entrega a lo largo de las vías nerviosas olfativas principales, desde la parte superior de la cavidad nasal directamente al cerebro [107] (Figura 5). Además, las vías nerviosas del nervio trigémino y el nervio olfatorio son otro punto de conexión entre los conductos nasales y el SNC. El nervio trigémino entra en el cerebro a través de la protuberancia anular y la lámina cribosa, facilitando el contacto con las regiones anterior y posterior del cerebro [110,111]. Otro posible efecto de la administración IN puede lograrse por la ubicación del sistema olfativo que se encuentra anatómicamente cerca de las regiones del cerebro asociadas

con el procesamiento de la información, tales como el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo, la corteza orbitofrontal y la corteza insular, las cuales también son estructuras implicadas en la emoción y el procesamiento del olor [112].

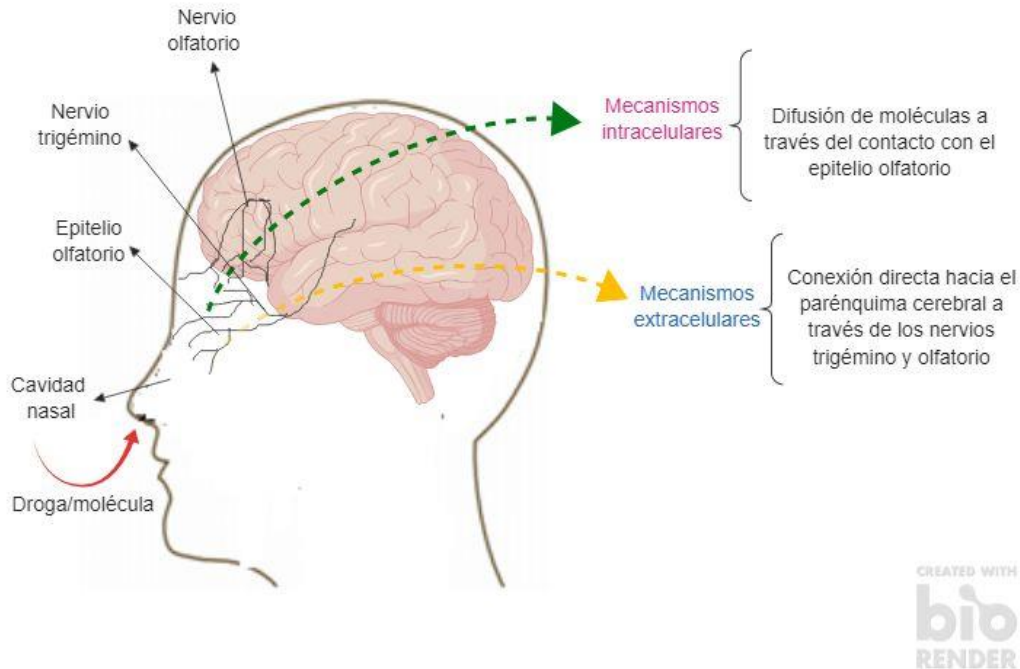


Figura 5. Diferentes mecanismos de entrega de fármacos Nariz-cerebro. Rutas para el transporte de fármaco desde la cavidad nasal al cerebro. Mecanismos de entrega intracelular (flecha verde) a través del epitelio olfatorio y los mecanismos de entrega extracelular a través de las terminaciones nerviosas (flecha amarilla). Tomado y modificado de Katare et al., 2017.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado la entrega de diversas sustancias por vía intranasal, dentro de las cuales se incluyen: el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el interferón 1β y la hipocretina-1 (orexina A), muestran importantes niveles de actividad en las ramas del nervio trigémino, el ganglio trigémino y la protuberancia, sugiriendo el papel protagónico de esta vía en la administración intranasal [110]. Además, en un experimento reciente con ratones, presenta a la corriente migratoria rostral como otro camino de acceso potencial para agentes administrados por vía intranasal. Compuestos de bajo peso molecular como la cocaína, dihidroergotamina [113], análogos de la prostaglandina [114], y el zolmitriptán [115] han sido reportados por entrar al sistema nervioso central a través de la administración nasal en animales. Además de estos, varios estudios han demostrado que la terapia por vía intranasal tiene potencial efecto para el tratamiento de diferentes trastornos neurológicos [116,117].

Particularmente para los aceites esenciales, estudios preclínicos y clínicos del aceite esencial de lavanda mostró efectos ansiolíticos después de su

inhalación[118,119]. El Linalool, es el principal constituyente de este aceite esencial y el efecto ansiolítico se atribuye principalmente al monoterpeno [120], el efecto ansiolítico de la inhalación de linalool se ha observado en otros estudios [101][120], evidenciando la efectividad de la administración IN para el Linalool y su relevancia en enfermedades del SNC. Alternativamente, los componentes de los aceites esenciales pueden activar las células olfativas y mediar mecanismos de señalización en el SNC a través del sistema olfativo [121].

Teniendo en cuenta dicha actividad y sus propiedades fisicoquímicas, el Linalool puede ser una molécula con gran potencial para ser llevada a un modelo de protección ante una lesión cerebral isquemia aguda siguiendo una ruta de administración IN. Así pues, todos los efectos e interacciones antes descritas generadas por el linalool pueden estar involucradas en la protección contra la progresión de los efectos neurodegenerativos, por esta razón esta molécula se considera una estrategia terapéutica prometedora y eficaz, cuya acción puede favorecer la neuroprotección y preservar la función neurológica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Basados en resultados previos donde la administración del linalool por vía oral genera efectos neuroprotectivos y en donde los resultados *in vitro* muestran una muy baja toxicidad por tratamientos con pre y post- excitotoxicidad con glutamato y aunque se tienen indicios de los mecanismos de acción del linalool, hace falta esclarecerlos completamente y sobre todo realizar investigaciones que faciliten y garanticen la entrega de la molécula al cerebro para asegurar los efectos beneficios de todas sus propiedades, por ello, se hace necesario realizar una investigación en la que el linalool sea administrado por vía intranasal, una vía que facilita el paso por la barrera hematoencefálica donde gracias a las propiedades aromáticas de la molécula brinda el potencial de ser administrarse como aerosol, lo cual lo perfila con un potencial enorme para ser evaluado en la prevención secundaria de la lesión cerebral aguda. Basados en lo anterior, es importante y novedoso realizar una investigación en donde el linalool se administre por esta vía y evalúe su potencial anti-inflamatoria *in vitro* en cultivos celulares primarios de astrocitos y microglia, como principales poblaciones celulares implicadas en la respuesta inflamatoria, y posterior muerte neuronal. Además, es importante estandarizar la administración intranasal a través de nanopartículas inhaladas en ratas isquémicas para evaluar su efectividad en la prevención y recuperación de la función cerebral post-infarto.

4. Hipótesis

HI: La administración intranasal de linalool produce un efecto neuroprotector en un modelo de accidente cerebrovascular isquémico que reduce la respuesta inflamatoria en astrocitos y microglia, ejerciendo protección en el tejido cerebral y mejorando la pérdida de la función motora, sensorial y cognitiva.

5. Objetivos

General

Validar la administración intranasal de linalool como candidato terapéutico en un modelo de infarto cerebral.

Específicos

- 1) Evaluar el mecanismo de acción anti-inflamatorio del linalool en cultivos primarios de astrocitos y microglia.
- 2) Establecer el volumen de infarto y la protección neurológica y motora de la administración intranasal de Linalool (25 mg/Kg) a las 24 horas y 7 días post isquemia en un modelo de infarto cerebral focal en ratas Wistar.
- 3) Determinar la eficacia terapéutica (protección tisular) del Linalool administrado vía intranasal en un modelo de infarto cerebral en ratas a un mes post-infarto.

6. Bibliografía

1. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26:1057–83.
2. Ferri CP, Schoenborn C, Kalra L, Acosta D, Guerra M, Huang Y, et al. Prevalence of stroke and related burden among older people living in Latin America, India and China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82:1074–82.
3. Green AR, Odergren T, Ashwood T. Animal models of stroke: Do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:402–8.
4. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M a. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. 4441. *Trends Neurosci.* 1999;22:391–7.
5. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell Mol Neurobiol.* Springer US; 2017;37:571–85.
6. Puig B, Brenna S, Magnus T. Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *Int J Mol Sci.* 2018;19:2834.
7. Mongin AA. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology.* 2007;14:183–93.
8. Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: Implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis.* 1999;9:193–201.
9. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2009. p. 355–69.
10. Wasay M, Khatri IA, Kaul S. Stroke in South Asian countries. *Nat Rev Neurol.* Nature Publishing Group; 2014;10:135–43.
11. Cordonnier C, Sprigg N, Sandset EC, Pavlovic A, Sunnerhagen KS, Caso V, et al. Stroke in women—from evidence to inequalities. *Nat Rev Neurol.* Nature Publishing Group; 2017;13:521–32.
12. Avezum Á, Costa-Filho FF, Pieri A, Martins SO, Marin-Neto JA. Stroke in Latin America: Burden of Disease and Opportunities for Prevention. *Glob. Heart.* 2015. p. 323–31.
13. Saposnik G, Del Brutto OH. Stroke in South America: A systematic review of incidence, prevalence, and stroke subtypes. *Stroke.* 2003. p. 2103–7.
14. Lavados PM, Hennis AJ, Fernandes JG, Medina MT, Legetic B, Hoppe A, et al. Stroke epidemiology, prevention, and management strategies at a regional level: Latin America and the Caribbean. *Lancet Neurol.* 2007;6:362–72.
15. Silva FA, Zarruk JG, Quintero C, Arenas W, Rueda-Clausen CF, Silva SY, et al. Cerebrovascular disease in Colombia. *Rev Colomb Cardiol.* 2006;13:85–9.

16. M.A. C, P. L, M. O, C. C-C, E. C, C. S, et al. Burden of cerebrovascular disease in Colombia. *Value Heal.* 2016;19:A57.
17. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV. Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ. Res.* 2017. p. 472–95.
18. Rutten-Jacobs LC, Larsson SC, Malik R, Rannikmäe K, consortium M, Consortium ISG, et al. Genetic risk, incident stroke, and the benefits of adhering to a healthy lifestyle: cohort study of 306 473 UK Biobank participants. *Bmj.* 2018;363:k4168.
19. Gardener H, Wright CB, Rundek T, Sacco RL. Brain health and shared risk factors for dementia and stroke. *Nat. Rev. Neurol.* 2015. p. 651–7.
20. Gorelick PB. Stroke Risk Factors. *Encycl Neurol Sci.* 2014. p. 326–8.
21. You RX, Donnan GA. Other risk factors for stroke. Serum risk factors for stroke. *Cardiovasc Risk Factors.* 1995;5:348–62.
22. Spence JD. Nutrition and stroke prevention. *Stroke.* 2006. p. 2430–5.
23. Prior PL, Suskin N. Exercise for stroke prevention. *Stroke Vasc. Neurol.* 2018. p. 59–68.
24. Hashimoto Y. Smoking and stroke. *Brain and Nerve.* 2011;63:483–90.
25. Boan AD, Bachman DL, Adams RJ, Lackland DT. Hypertension and diabetes associated with secondary stroke among Caucasians and African Americans. *J Clin Hypertens.* 2009;1):A142 ST-Hypertension and diabetes associated wi.
26. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis Elsevier Inc.;* 2008;32:200–19.
27. Rochfort KD, Cummins PM. The blood–brain barrier endothelium: a target for pro-inflammatory cytokines: Figure 1. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:702–6.
28. Guell K, Bix GJ. Brain endothelial cell specific integrins and ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 2014;14:1287–92.
29. Osada T, Gu YH, Kanazawa M, Tsubota Y, Hawkins BT, Spatz M, et al. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by B 1-integrins. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31:1972–85.
30. Izawa Y, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Hawkins BT, Koziol JA, et al. β 1-integrin–matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38:641–58.
31. Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation.
32. Plata-Salaman CR. Brain cytokines and disease. *Acta Neuropsychiatr.* 2002. p. 262–78.
33. Li M, Li C, Yu H, Cai X, Shen X, Sun X, et al. Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-

induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J Neuroinflammation*. 2017;14:1–12.

34. Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation*. 2008;5.

35. Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ, Luheshi GN. Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J Neurochem*. 2002;83:754–63.

36. Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: Modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation*. 2010;7.

37. Murray KN, Parry-Jones AR, Allan SM. Interleukin-1 and acute brain injury. *Front Cell Neurosci*. 2015;9.

38. Moreno VP, Subirá D, Meseguer E, Llamas P. IL-6 as a biomarker of ischemic cerebrovascular disease. *Biomark. Med*. 2008. p. 125–36.

39. Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and Stroke: Putative Role for Cytokines, Adhesion Molecules and iNOS in Brain Response to Ischemia. *Brain Pathol*. 2006;10:95–112.

40. Dvorientchikova G, Barakat D, Brambilla R, Agudelo C, Hernandez E, Bethea JR, et al. Inactivation of astroglial NF- κ B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci*. 2009;30:175–85.

41. Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. Sustained, neuron-specific IKK/NF- κ B activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener*. 2013;8:1–18.

42. Huang F-P, Wang Z-Q, Wu D-C, Schielke GP, Sun Y, Yang G-Y. Early NF κ B activation is inhibited during focal cerebral ischemia in interleukin-1beta-converting enzyme deficient mice. *J Neurosci Res*. 2003;73:698–707.

43. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005. p. 475–82.

44. Aktories K, Cooper MD. NF- κ B in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;349:265–8.

45. Choi BH, Kang KS, Kwak MK. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease. *Molecules*. 2014. p. 12727–59.

46. Y. N, E. H, K. Y, T. I. A novel Nrf2 activator, RS9, inhibits blood-retinal barrier permeability in rabbits. *J Pharmacol Sci*. 2015;128:S176.

47. Shih AY. A Small-Molecule-Inducible Nrf2-Mediated Antioxidant Response Provides Effective Prophylaxis against Cerebral Ischemia In Vivo. *J Neurosci*. 2005;25:10321–35.

48. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, et al. A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J Neuroinflammation*. 2016;13:1–20.
49. Bell KFS, Al-Mubarak B, Martel M-A, McKay S, Wheelan N, Hasel P, et al. Neuronal development is promoted by weakened intrinsic antioxidant defences due to epigenetic repression of Nrf2. *Nat Commun*. 2015;6:7066.
50. Cuadrado A, Martín-Moldes Z, Ye J, Lastres-Becker I. Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the rho family, GTP-binding protein RAC1 during Inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289:15244–58.
51. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:621–6.
52. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. 2017. p. 585–97.
53. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. 2007;10:1377–86.
54. Cekanaviciute E, Buckwalter MS. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*. 2016. p. 685–701.
55. Wagner DC, Scheibe J, Glocke I, Weise G, Deten A, Boltze J, et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73:79–87.
56. Roy G, Ding S. Neurobiology of Disease Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. Elsevier Inc.; 2015.
57. Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Rev*. 2005;48:196–206.
58. Luo XG, Chen S Di. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl. Neurodegener*. 2012.
59. Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*. 2009. p. 1030–8.
60. Butovsky O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. Springer US; 2018;19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>
61. Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F. Microglia and ischemic stroke: A double-edged sword. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol*. 2013. p. 73–90.
62. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015;148:63–106.

63. Bohlmann J, Keeling CI. Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 2008. p. 656–69.
64. Khoo HE, Azlan A, Kong KW, Ismail A. *Phytochemicals and Medicinal Properties of Indigenous Tropical Fruits with Potential for Commercial Development. Evidence-based Complement Altern Med.* Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.
65. Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL, Leach DN. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J.* 1999;14:322–32.
66. Luo Y, Li BZ, Liu D, Zhang L, Chen Y, Jia B, et al. Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. *Chem Soc Rev.* 2015;44:5265–90.
67. Schults RE. *Dictionary of alkaloids.* J. Ethnopharmacol. 1990.
68. Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, et al. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) Induce Apoptosis in Endometrial Cancer Cells through the Activation of p53. *PLoS One.* 2012;7.
69. Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2008;263:1–13.
70. Setzer WN, Setzer MC. Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents. *Mini Rev Med Chem.* 2003;3:540–56.
71. Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM, Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2009;63:643–9.
72. Graebin CS, Madeira M de F, Yokoyama-Yasunaka JKU, Miguel DC, Uliana SRB, Benitez D, et al. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. *Eur J Med Chem.* 2010;45:1524–8.
73. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J, et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J.* 2009;24:348–54.
74. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2474–8.
75. Camargos HS, Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, Dorta ML, Alonso A. Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC₅₀ values. *PLoS One.* 2014;9.
76. Singh BK, Tripathi M, Pandey PK, Kakkar P. Nimesulide aggravates redox imbalance and calcium dependent mitochondrial permeability transition leading to dysfunction in vitro. *Toxicology.* 2010;275:1–9.
77. Boelsterli UA, Lim PLK. Mitochondrial abnormalities-A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007. p. 92–107.

78. Burgos, E; Serranillos MP. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem*. 2012;19:5319–41.
79. Zhang ZY, Daniels R, Schluesener HJ. Oridonin ameliorates neuropathological changes and behavioural deficits in a mouse model of cerebral amyloidosis. *J Cell Mol Med*. 2013;17:1566–76.
80. Sabogal-Guáqueta AM, Osorio E, Cardona-Gómez GP. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology*. 2016;102:111–20.
81. DeFeudis F V. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on gene expression: Possible relevance to neurological disorders and age-associated cognitive impairment. *Drug Dev. Res*. 2002. p. 214–35.
82. Zeng G rong, Zhou S da, Shao Y jie, Zhang M hong, Dong L ming, Lv J wei, et al. Effect of Ginkgo biloba extract-761 on motor functions in permanent middle cerebral artery occlusion rats. *Phytomedicine*. 2018;48:94–103.
83. Yang L, Calingasan NY, Thomas B, Charturvedi RK, Kiaei M, Wille EJ, et al. Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription. *PLoS One*. 2009;4.
84. Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: Relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2005;19:96–107.
85. Logani S, Chen MC, Tran T, Le T, Raffa RB. Actions of Ginkgo Biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. *Life Sci*. 2000;67:1389–96.
86. Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci*. 2006;78:719–23.
87. Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38:162–6.
88. Cheng BH, Sheen LY, Chang ST. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice. *J Tradit Complement Med*. Elsevier Ltd; 2015;5:27–34.
89. Seol G-H, Kang P, Lee HS, Seol GH. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *BMC Neurol*. *BMC Neurology*; 2016;16:4–9.
90. De-Cássia R, Andrade L, De-Sousa D. A Review on anti-Inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* [Internet]. 2013;18:1227–54. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/1/1227/>
91. Souto-Maior FN, de Carvalho FL, de Moraes LCSL, Netto SM, De Sousa DP, de Almeida RN. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;100:259–63.

92. Xu F, Uebaba K, Ogawa H, Tatsuse T, Wang B-H, Hisajima T, et al. Pharmacophysio-psychologic effect of Ayurvedic oil-dripping treatment using an essential oil from *Lavendula angustifolia*. *J Altern Complement Med*. 2008;14:947–56.
93. Mesfin M, Asres K, Shibeshi W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14.
94. Aprotosoae AC, Hăncianu M, Costache II, Miron A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J*. 2014;29:193–219.
95. Shi F, Zhao Y, Firempong CK, Xu X. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers. *Pharm Biol*. 2016;54:2320–8.
96. Imani Z, Asgarpanah J, Hashemi F, Hashemi Hezaveh J. Composition and antifungal activity of *Zhumeria majdae* essential oil. *Curr Med Mycol*. 2015;1:13–9.
97. Shen CY, Jiang JG, Zhu W, Ou-Yang Q. Anti-inflammatory effect of essential oil from citrus aurantium L. var. amara Engl. *J Agric Food Chem*. 2017;65:8586–94.
98. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Phyther Res*. 2012;26:381–6.
99. Devi SL, Kannappan S, Anuradha C V. Evaluation of in vitro antioxidant activity of Indian bay leaf, *Cinnamomum tamala* (Buch. -Ham.) T. Nees & Eberm using rat brain synaptosomes as model system. *Indian J Exp Biol*. 2007;45:778–84.
100. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems. *Am J Med [Internet]*. 1991;91.
101. Linck VM, da Silva AL, Figueiró M, Caramão EB, Moreno PRH, Elisabetsky E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*. 2010;17:679–83.
102. Park H, Seol GH, Ryu S, Choi IY. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. *Arch Pharm Res. Pharmaceutical Society of Korea*; 2016;39:555–64.
103. Li Y, Lv O, Zhou F, Li Q, Wu Z, Zheng Y. Linalool Inhibits LPS-Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells by Activating Nrf2. *Neurochem Res*. 2015;40:1520–5.
104. Sabogal-Guáqueta AM, Posada-Duque R, Cortes NC, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. *Neuropharmacology*.

2018;135:555–71.

105. Coelho VR, Giancesini J, Von Borowski R, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Picada JN, et al. (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. *Phytomedicine* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2011;18:896–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.02.010>

106. Illum L. Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 2003. p. 187–98.

107. Chapman CD, Frey WH, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, et al. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm. Res*. 2013. p. 2475–84.

108. Dhuria S V., Hanson LR, Frey WH. Novel vasoconstrictor formulation to enhance intranasal targeting of neuropeptide therapeutics to the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:312–20.

109. Graff CL, Pollack GM. Nasal drug administration: Potential for targeted central nervous system delivery. *J. Pharm. Sci*. 2005. p. 1187–95.

110. Johnson NJ, Hanson LR, Frey WH. Trigeminal pathways deliver a low molecular weight drug from the nose to the brain and orofacial structures. *Mol Pharm*. 2010;7:884–93.

111. Badhan RKS, Kaur M, Lungare S, Obuobi S. Improving brain drug targeting through exploitation of the nose-to- brain route: a physiological and pharmacokinetic perspective. *Curr Drug Deliv*

112. Benarroch EE. Olfactory system: functional organization and involvement in neurodegenerative disease. *Neurology*. 2010;75:1104–9.

113. Wang Y, Aun R, Tse FLS. Brain uptake of dihydroergotamine after intravenous and nasal administration in the rat. *Biopharm Drug Dispos*. 1998;19:571–5.

114. Yamada K, Hasegawa M, Kametani S, Ito S. Nose-to-brain delivery of TS-002, prostaglandin D2 analogue. *J Drug Target*. 2007;15:59–66.

115. Jain R, Nabar S, Dandekar P, Vandana P. Micellar nanocarriers: Potential nose-to-brain delivery of zolmitriptan as novel migraine therapy. *Pharm Res*. 2010;27:655–64.

116. Modi PR, Patel G V., Daslaniya DJ, Patel UL, Bhimani B V. Nose to brain drug delivery system: A review. *Res J Pharm Technol*. 2013;6:345–50.

117. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. Elsevier B.V.; 2012;64:614–28.

118. Bradley BF, Starkey NJ, Brown SL, Lea RW. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:517–25.

119. Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine*. 2012;19:529–34.
120. Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K, Sakaniwa M, Morita M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;85:713–21.
121. Takahashi M, Satou T, Ohashi M, Hayashi S, Sadamoto K, Koike K. Interspecies {Comparison} of {Chemical} {Composition} and {Anxiolytic}-like {Effects} of {Lavender} {Oils} upon {Inhalation}. *Nat Prod Commun*. 2011;6:1769–74.

CAPÍTULO II

“Microglia are the targeted population during neurological protection induced by intranasal linalool postischemia”

Microglia are the targeted population during neurological protection induced by intranasal linalool postischemia

Angela María Barrera-Sandoval¹, Angélica María Sabogal Guaqueta¹, Edison Osorio², Gloria Patricia Cardona-Gómez^{1*}

¹ Neuroscience Group of Antioquia, Cellular and Molecular Neurobiology Area - School of Medicine, SIU, University of Antioquia, Calle 70 # 52-21, Medellín, Colombia. ² Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Running title: Intranasal linalool generates neurological protection postischemia

Highlights:

Infarct volume and neurological recovery after ischemia by intranasal linalool

Microglia are targeted by intranasal linalool-induced protection

Nrf-2 microglial redistribution under anti-inflammatory conditions induced by linalool

*Corresponding author: Gloria Patricia Cardona-Gómez, Universidad de Antioquia, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Calle 62 # 52 – 59; Torre 1, Piso 4, Laboratorio 412; Medellín, Colombia. Phone: 57-4-2196458; Fax: 57-4-2196444. Email: patricia.cardonag@udea.edu.co

Abstract

Stroke is the second leading cause of death and first leading cause of physical disability around the world; it affects the brain parenchyma through oxygen deficiency and spreads excitotoxicity. The complexity of the disease has made it difficult to find effective therapies. It is necessary to identify new treatments that effectively act within the narrow therapeutic window but also offer long-term protection poststroke. Our previous work found that oral linalool reversed the central and peripheral pro-inflammatory phospholipidomic biomarkers in ischemic rats; based on these observations, we sought to test whether intranasal administration of linalool has a faster delivery to the central nervous system to protect it after focal ischemia in Wistar rats. The ischemic animals treated with linalool (25 mg/kg) showed a decrease in infarct volume at 24 hours and seven days, and the treated animals had better neurological and motor skills at both poststroke times. Additionally, one month after daily intranasal administration of linalool, the ischemic rats showed improved relearning performance in the Morris water maze test. They also exhibited a reduction in microgliosis and decreased COX2, IL-1Beta and Nrf2 markers in the cerebral cortex and hippocampus. In astrocyte and microglial cultures, linalool reduced pro-inflammation and had a potent effect on microglial cells, generating Nrf2 subcellular redistribution under glutamate excitotoxicity conditions. Together, our findings indicate an acute and chronic recovery after ischemia induced by a daily intranasal puff of linalool, which mainly acts on microglial populations with anti-inflammatory actions.

Key words: Stroke, intranasal, linalool, microglia, anti-inflammation, Nrf2, neurological recovery.

Abbreviations:

ROS: reactive oxygen species

BBB: blood-brain barrier

TNF α : tumor necrosis factor α

HIV: human immunodeficiency virus

tPA: tissue plasminogen

FDA: Food and Drug Administration

NMDA: N-methyl-D-aspartate

NIH: National Institutes of Health

SIU: Sede de Investigación Universitaria

Sham ct: Sham control group

Sham lin: sham linalool

Isch ct: ischemic control

Isch lin: ischemic linalool

MCA: middle cerebral artery

MWM: Morris water maze

GFAP: monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein

IL-1 β : Interleukin-1 beta

IL-6: Interleukin-6

Introduction

Brain stroke is a leading cause of disability and mortality around the world [1], and it has an increased incidence in low- and middle-income countries [2]. Eighty-seven percent of the cases are produced by ischemic conditions [3,4] when cerebral blood flow is transiently or permanently reduced [5], and the other 13% are due to hemorrhagic causes. The main risk factors for stroke are comorbidities such as hypertension, heart disease, diabetes, and unhealthy habits [6]. Only 10% of patients recover completely [7].

The change in cerebral blood flow restricts the availability of substrates, particularly oxygen and glucose, leading to energy failure at the ischemic core and overloaded glutamate release, which spreads excitotoxicity to neighboring brain areas and generates the penumbra zone [3,5]. The metabolic imbalance diffuses through axons and circuits and is followed by poor regulation of molecules, ions, amino acids, and proteins. This poor regulation contributes to secondary injuries in which neurons suffer depolarization and channel activation is dysregulated; this leads to increased calcium influx and ATP release in the parenchyma, which disrupts homeostasis and affects neural plasticity [3,8]. Additionally, the ionic imbalance affects mitochondrial function, resulting in high amounts of reactive oxygen species (ROS) and apoptotic cell death [9]. Moreover, these radicals activate metalloproteases, resulting in leakage at the neurovascular unit (NVU) (formed by astrocytes, pericytes, endothelium cells, neurons, and microglia) and consequent disruption of the blood-brain barrier (BBB) [10]. Alteration of BBB permeability and immune cell migration exacerbates the inflammatory response [11], increasing pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin-6 (IL-6) [12,13], and IL-1 β [14], which worsen the brain impairment and reduce the possibility of adequate recovery. Therefore, it is necessary to find a therapy that blocks the excitotoxic cascade and acts rapidly in a narrow therapeutic window, ideally during patient transport to the hospital. Therefore, intranasal administration is an excellent delivery strategy because it avoids the BBB and reaches the brain faster than other routes of administration [15]. This administration has been tested to deliver peptides and proteins [16–18], small interfering RNA (siRNA) for human

immunodeficiency virus (HIV) attenuation [19], siRNA for neuroprotection in the post-ischemic brain [20], and nanoparticles for Parkinson's disease treatment [21].

It is difficult to find effective treatments because of the temporal-spatial pathology of stroke. An anti-thrombolytic agent, tissue plasminogen (tPA), was recently approved by the FDA. In addition to the recanalization of vessels when the clot obstruction is incompatible with life, a small number of patients may receive the new treatment [22,23]. In this study, we evaluated the intranasal administration of the monoterpene linalool because it is a promising molecule present in several medicinal plants and has antioxidant and anti-inflammatory properties in recovering neuronal injury [24]. It has also been described as an agonist of PPAR α [25] and antagonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (29). Interestingly, our previous study showed that oral linalool had a neuroprotective effect, decreased histopathological markers in an aging mouse model of Alzheimer's disease, and restored cognitive and emotional functions [26]. In addition, we recently found that oral linalool prevented a phospholipidomic pro-inflammatory profile in the hippocampus and serum [27]. However, with future translational therapy in mind and considering the limited availability of plant monoterpenes for oral administration and the narrow therapeutic window after stroke, we needed to assess whether intranasal linalool administration was effective. We also sought to determine whether the protection had long-term postischemia effects and to discover the cell population involved in its protective and anti-inflammatory mechanism after its intranasal administration

Materials and methods

All animal procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition, published by the National Institutes of Health (NIH) and Colombian standards (law 84/ 1989 and resolution 8430/1993). These procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation at the University of Antioquia, Medellín, Colombia.

Animal Procedures

Male Wistar albino rats were obtained from our in-house, pathogen-free colony at the vivarium at SIU (Sede de Investigación Universitaria) (University of Antioquia, Medellín, Colombia). The rats were maintained under a 12:12 h dark: light cycle and received food and water ad libitum. Special care was taken to minimize animal suffering and reduce the number of animals used. Three-month-old rats weighing 300 to 360 g were used. Three to eight rats per experimental group were used for the neurological scoring and motor tests. Rats were randomly divided into 4 groups as follows: two sham groups in which animals underwent identical procedures except the occlusion of arteries and received vehicle (formulation agents of solution) for the sham control group (sham ct), and sham linalool (sham lin) vehicle plus linalool 25 mg/kg/d; and two groups that

were subjected to focal middle cerebral artery occlusion (tMCAO) and were denoted as the ischemic control (isch ct; and vehicle) and ischemic linalool (isch lin; 25 mg/kg/d). All rats were administered an intranasal dose of linalool or vehicle every 24 h for one month using Aeronab nebulizer (AG-ALS-HLD-RAT, HLd-RL, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT 06790, USA). Behavioral tests were performed during this period. Previously, 25 mg/kg linalool had not shown toxicity [26], and the interval between drug treatment and assays was selected based on previous *in vivo* studies ([26–28]. Among the animals for the behavioral analysis, three per experimental group were used for histological assessment. In this study, the cerebral ischemia procedure produced 50% mortality in a Wistar rat strain from Harlan, USA.

Middle cerebral artery occlusion

The rats were anesthetized with an intraperitoneally administered mixture of ketamine (60 mg/kg; Holliday Scott S.A. Int. Neyer, Buenos Aires, Argentina) and xylazine (5 mg/kg; Synthesis LTDA & CIA S.C.A., Bogota', Colombia) and subcutaneously administered atropine (100 mg/kg; ERMA S.A., Bogota', Colombia). The rats received a mixture of 2–4% isoflurane (Baxter, Deerfield, IL, USA) and 96% oxygen via an inhalation anesthesia machine. The right common carotid artery was exposed and dissected. The right external carotid artery and the right internal carotid artery were exposed, and the first arterial branches were cauterized by electrocoagulation (AARON bipolar cautery, Albany, NY, USA). A 4-0 monofilament nylon suture (Corpaul, Bogotá, Colombia) was inserted into the internal carotid artery from the external carotid artery to occlude the right middle cerebral artery (MCA) at its origin. The nylon filament tips had been previously rounded by passing them through a flame and were coated with a poly-L-lysine solution (0.1% w/v in deionized water; Sigma, St. Louis, MO, USA). The suture was removed to enable reperfusion after 60 min, and the wound was then closed. Sham-operated animals underwent identical procedures, excluding insertion of the suture and cauterization.

Determining Infarct Volume

The rats were sacrificed in a CO₂ chamber for 30 seconds at 24 hours and 7 days after ischemic stroke. Their brains were carefully removed, cooled in phosphate-buffered saline for 5 min, and sliced coronally every 2 mm using a rat brain matrix (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). The slices were stained by 0.5% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma) and dissolved in physiologic buffer solution for 30 min at 37° in the dark. Brain infarct size was measured in ImageJ software (version 1.0; US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), and infarct areas were integrated for calculating infarct volume. The total volume of each hemisphere and infarction was determined by integrating areas in each slice. Infarct volume was calculated using a previously described method [29]. The infarction volume was expressed in cubic millimeters and as a percentage.

Neurological Evaluation

The neurological performance was evaluated 6 h after cerebral ischemic stroke. The neurological function was scored on an 18-point scale based on the Garcia test [30]. The neuroscore was based on the following six different neurological tests: (1) spontaneous activity, (2) symmetry in limb movement, (3) forepaw outstretching, (4) climbing, (5) body proprioception, and (6) response to vibrissae touch. Each test was scored with a maximum of three points based on a set of predetermined criteria described by Garcia and colleagues [30]. The scores of each test were summed; the highest possible score was 18 points, indicating no neurological deficits, and the lowest possible score was three points, indicating severe impairment. The neurological assessments were performed daily in the same order and at the same time for all rats.

Inclined plane test

Each animal's ability to maintain postural stability was assessed using the inclined plane test. The relative angle at which the rat could no longer maintain its position for 10 s was recorded as the final angle, and it was considered a measure of functional impairment [31].

Morris water maze

The animals were evaluated in the Morris water maze (MWM) 19 days after ischemia. The test was performed using a previously described method [27,32]. Briefly, a black plastic tank was filled with water (22 ± 2 °C), and visual clues around the room remained in a fixed position throughout the experiment. The hidden platform (12 cm diameter) was submerged 3 cm below the water level during spatial learning and 1.5 cm above the surface of the water during the visible session. Six sessions or trials were performed. Each session consisted of four successive subtrials (30 s intertrial intervals), and each subtrial began with the rat being placed pseudorandomly in one of four starting locations. Then, the animals were provided with a 48 h retention period, followed by a probe trial of spatial reference memory, in which the animals were placed in the tank without the platform for 90 s. The latency to reach the exact former location of the platform was recorded during the probe trial. Later, the platform was moved to a new location, and each animal's ability to learn the new location was measured by determining the latency in 4 sessions conducted in the same manner as the learning phase. The latency to reach the platform was evaluated using a visible platform to control for any differences in visual-motor abilities or motivation between the experimental groups; the animals that could not perform this task were excluded. An automated system (Viewpoint, Lyon, France) recorded the behavior of the animals.

Histology

Twenty-four hours after the final behavioral test, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) plus xylazine (20 mg/kg) and were perfused with a 0.9% saline solution and 4% paraformaldehyde (0.1 M PBS, pH 7.4). Brains were removed and postfixed with 4% paraformaldehyde at 4 °C for 48 h, then incubated with sucrose and stored in a glycol-glycerol-based cryoprotectant at - 20 °C. The brains were sectioned (50 µm) with a Leica VT1000S vibrating blade microtome (Leica Microsystems, Germany). The ipsilateral hippocampus (main hippocampal side affected by the occlusion of the cerebral middle artery) was analyzed at bregma -2.30 mm [33].

Immunohistochemistry

Coronal sections (50 µm) were pre-treated with Tris HCl solution for 5 min at 80 °C and permeabilized with 30% Triton X-100 for 5 min. They were blocked with 1% BSA in PBS and then probed with the following primary antibodies using a previously described protocol [26]: anti-GFAP (monoclonal anti-gial fibrillary acidic protein, #G 3893, Sigma, 1:500), and anti-Iba1 (rabbit anti-Iba1, ionized calcium binding adaptor molecule, #019e19741, Wako, 1:500). The tissues incubated in the absence of primary antibody did not display immunoreactivity. Quantification of immunoreactivity in the areas examined was determined using a 40x objective and was analyzed using Fiji ImageJ 1.45 software (NIH, USA). The images were modified to a binary system, and integrated densities (relative units) were obtained for each image. The background was automatically subtracted in each image for quantification of the relative intensity of immunostaining as previously described by Gutierrez-Vargas and colleagues [29].

***In vivo* immunofluorescence**

To enhance antigen exposure, the tissue sections were pretreated with buffered saline containing Tris-HCl, pH 5.8. The sections were preincubated with Triton X-100 in PBS (TXPBS) and 3% BSA for 60 min at room temperature. The sections were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: anti-GFAP (monoclonal, #G 3893, Sigma), anti-Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 - nrf2, ab89443 - Abcam 1:350), anti-Interleukin-1 beta ((IL-1β), 2522245 Ref: MABF18, Millipore, Bedford, MA, 1:350), NF-κB p65 (#8242, Cell Signaling Technology, 1:350), and Hoechst (1:5000 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The primary antibodies were diluted in TXPBS and 1% BSA. Then, the sections were washed four times with 0.1 M PBS and incubated with Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488 secondary antibodies against mouse and rabbit (1:750; Invitrogen CA, USA) for 90 min at room temperature. The sections were washed four times with buffer, mounted on cover slips using Gel Mount (Biomed) and observed under an Olympus IX 81 epifluorescence microscope (Olympus, Japan). Omission of the primary antibodies resulted in a lack of staining. The sections were photographed at 40x magnifications. Those images

were analyzed by evaluating the fluorescence intensity of GFAP and COX-2, IL-1 β , Iba-1, GFAP, NrF2, and NF- κ B immunostaining using Fiji ImageJ 1.45.

Primary astrocyte and microglial cultures

The cortices of neonatal Wistar rats (PN 1–2) were dissected, trypsinized, dissociated, and cultured in 75-cm² flasks at 37 °C and 5% CO₂ (De Marinis et al., 2013). The culture medium was changed after one day of culture and then twice per week. The astrocyte-enriched cultures were obtained beginning at 8 days *in vitro* (DIV), and the flasks were shaken at 37 °C at 350 rpm in a sequence of 24 h and 48 h in which the culture medium was collected and then washed at each time interval. This procedure was performed to minimize the presence of microglia. The washed media was collected in 75-cm² flasks to isolate microglial cells. The cell confluency was observed at 10 DIV, and there were approximately 4 × 10⁶ astrocytes that were characterized by a flat, polygonal morphology; at 14 DIV, the flasks with microglia contained approximately 1 × 10⁶ cells. Subsequently, the astrocytes and the microglial were subcultured using 0.25% trypsin/EDTA (GIBCO) 24-well plates at densities of 1 × 10⁵ astrocytes and 8 × 10⁴ microglial cells. At 24-26 DIV, the astrocytes and microglia were treated with 125 μ M glutamate for 20 minutes and with 100 nM linalool for 24 hours.

***In vitro* Immunofluorescence**

Cultures were fixed with 4% formaldehyde prepared in a cytoskeleton buffer for 20 min. Autofluorescence was blocked with 50 mM NH₄Cl. Cells were permeabilized and blocked with PBS with 0.1% Triton X-100 and 1% fetal bovine serum for 1 h. Cultures were incubated with the following primary antibodies overnight at 4 °C: anti-GFAP (monoclonal, #G 3893, Sigma, 1:500); anti-Iba1 (rabbit, #019e19741, Wako, 1:500); anti-COX-2 (ab15191, rabbit, Abcam, 1:500) anti-Nrf2 (ab89443 - Abcam 1:350); anti-IL-1 β (2522245 Ref: MABF18, Millipore, Bedford, MA, 1:350), and NF- κ B p65 (#8242, Cell Signaling Technology, 1:350). Alexa Fluor 488- or 594- conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (1:750, Molecular Probes) were used as probes. Hoescht 33258 (1:5,000, Invitrogen) and phalloidin conjugated to Alexa Fluor 594 (1:750, Molecular probes) were added for 1 h for nuclear and F-actin staining, respectively. The cells were washed four times with PBS and cover-slipped using Fluorosave (Calbiochem). They were observed under an Olympus IX 81 epifluorescence microscope. No staining was observed when the primary antibodies were omitted. The images were captured using an oil immersion objective (60X, NA 1.42), and then intensity of immunofluorescence was quantified in the Image-Pro software (Olympus) and ImageJ (NIH).

Cytokines measurements

The cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF α) concentrations were measured using the Multiplex cytokine profiling immunoassay, Biolegend (San Diego, CA 92121). All the samples (astrocytes, microglia supernatants and serum) were thawed, and all reagents were warmed to room temperature (RT) (20 - 25 °C) before use. The plate was prewet by adding 100 μ L of 1x Wash Buffer to each well and incubating for 1 min at room temperature before removal. All standard dilutions were performed and were arranged on the plate in a sequential order, adding 25 μ L of each known concentration to the standard wells. In the next step, the mixed beads were vortexed for 30 s, and 25 μ L of mixed beads was added to each well while shaking the bead bottle intermittently to avoid bead settling. Then, the samples were added; for the cell culture supernatant and serum samples, we added 25 μ L of assay buffer to all wells and 25 μ L of each sample to the sample wells. The plate was wrapped with aluminum foil and placed on a plate shaker for 500 rpm for 2 h at RT. After the incubation, the plate were centrifuged at 1,000 g for 5 min. Without inverting the contents, the plate was removed, and 200 μ L of 1x wash buffer was added to each well. The plate was centrifuged again, and the excess wash buffer was removed from the bottom of the plate using a multichannel pipette. For the next step, we added 25 μ L of detection antibodies to each well, and the entire plate was wrapped with aluminum foil and placed on a plate shaker for 500 rpm for 1 h at RT. Without vacuuming, 25 μ L of SA-PE reagent was added directly to each well, and then the plate was wrapped with aluminum foil and placed on a plate shaker for 500 rpm for 30 min at RT. After this incubation, the wells were washed again by adding 200 μ L of 1x Wash Buffer to each well, and the contents of the plate were resuspended on the plate shaker for 1 min. Finally, using a pipet, the samples were transferred from the plate to FACS tubes to read samples on a flow cytometer (BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, California).

Statistical analyses

The sample sizes (n) used for the statistical analyses were the numbers of animals in each experimental group. The homogeneity of variance was tested before performing the statistical analysis. The parametric data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test to compare several independent groups in the cellular, histological and physiological analyses. The behavioral experiment results and neurological test performance were analyzed by repeated-measures ANOVA. If the results did not meet the criteria established by the ANOVA test, then they were analyzed as nonparametric data and the Kruskal - Wallis test and Dunnett post hoc test were performed. For each condition of *in vitro* experiments, the sample size was 3, and all experiments were performed in duplicate. All of the sample groups were processed in parallel to reduce interassay variation. The data are expressed as the means \pm the SEMs. Analyses were performed using SPSS 17.0 (Chicago, IL,

USA) and PRISM software. The results were considered significant when $p < 0.05$; * indicates $p < 0.05$, ** or *** indicates $p < 0.001$.

Results

Intranasal linalool blocked infarct volume in acute and intermediate postischemia window

the beneficial effects of daily intranasal linalool were first observed 24 hours after ischemic stroke. There was a significant reduction in infarct volume from 22.8% in ischemic animals to 5.0% in the treated animals (Fig. 1B, D). This trend continued during the next seven days of evaluation as the infarct area decreased significantly from 10.67% to 4.66% (Fig. 1B, E). These results suggest a remarkable neuroprotective effect of the molecule by intranasal delivery.

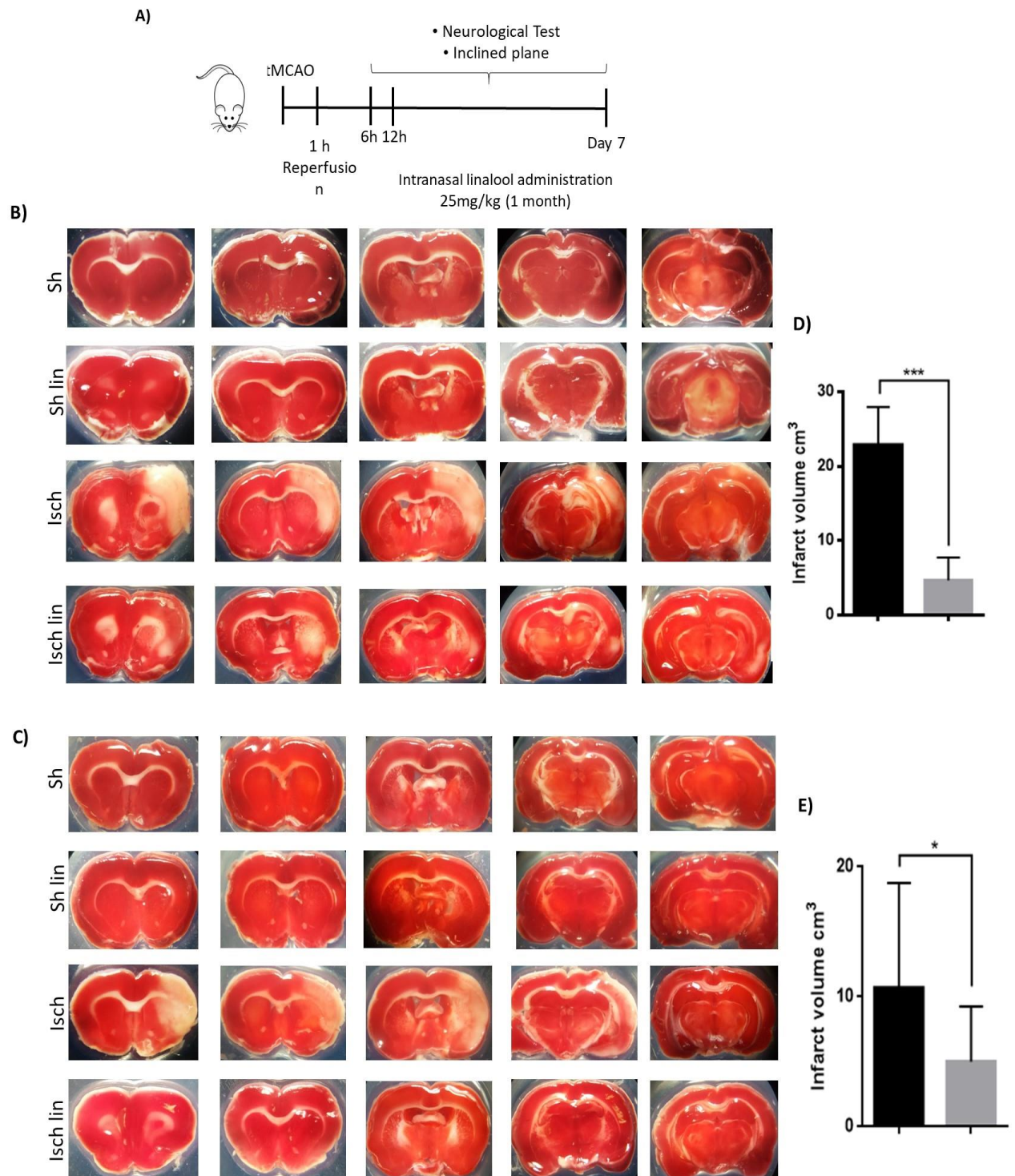


Figure 1. Intranasal linalool decreased infarct volume at 24 hours and seven days postischemia. A) Scheme of experimental design in vivo where the intranasal delivery of linalool began at 6 hours after tMCAO or sham operations and continued for the next seven days. B) Representative images of TTC-stained sections at 24 hours after ischemia. Sh ct: Sham control; sh lin: sham linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic linalool. C) Representative images of TTC-stained sections 7 days after ischemia. Sh ct: Sham control; sh lin: sham linalool; isch: ischemic control; isch lin: ischemic linalool. The values in the bar graphs are expressed in cubic centimeters of infarct volume (cm³) 24 hours after ischemia D) and seven days after ischemia E). n = 3-5 per group. *p<0.05; **p 0.01; ***p<0.001. Welch two samples T test.

Postischemic neurological and cognitive improvement after prolonged intranasal linalool

The neurological and motor performance was evaluated from 6 hours to 7 days after ischemia (Fig. 2A). The inclined plane test showed a significant motor impairment in ischemic rats presenting lower angle ascent (grade 47) in comparison to the sham groups with and without linalool (grade 55 to 60) on the third to seventh days (Fig. 2B) ($P < 0.001$). Interestingly, the linalool-treated ischemic rats had a similar performance as the sham rats. Complementarily, those results were supported by the progressive neurological score improvement of the ischemic rats treated with intranasal linalool compared to the ischemic group without treatment on the second to seventh day ($P < 0.001$). The linalool-treated rats had similar skills to the sham groups on the sixth and seventh days (Fig. 2C), suggesting protective properties of intranasal linalool without affecting the sham animals. The water maze test evaluated the long-term effect of linalool on the cognitive function of ischemic rats. There were not differences in the learning and memory tests between groups (Fig. 2 D, E). The re-learning test showed higher latencies for ischemic rats compared to the sham groups, and this effect was significantly prevented by intranasal linalool treatment (Fig. 2 F).

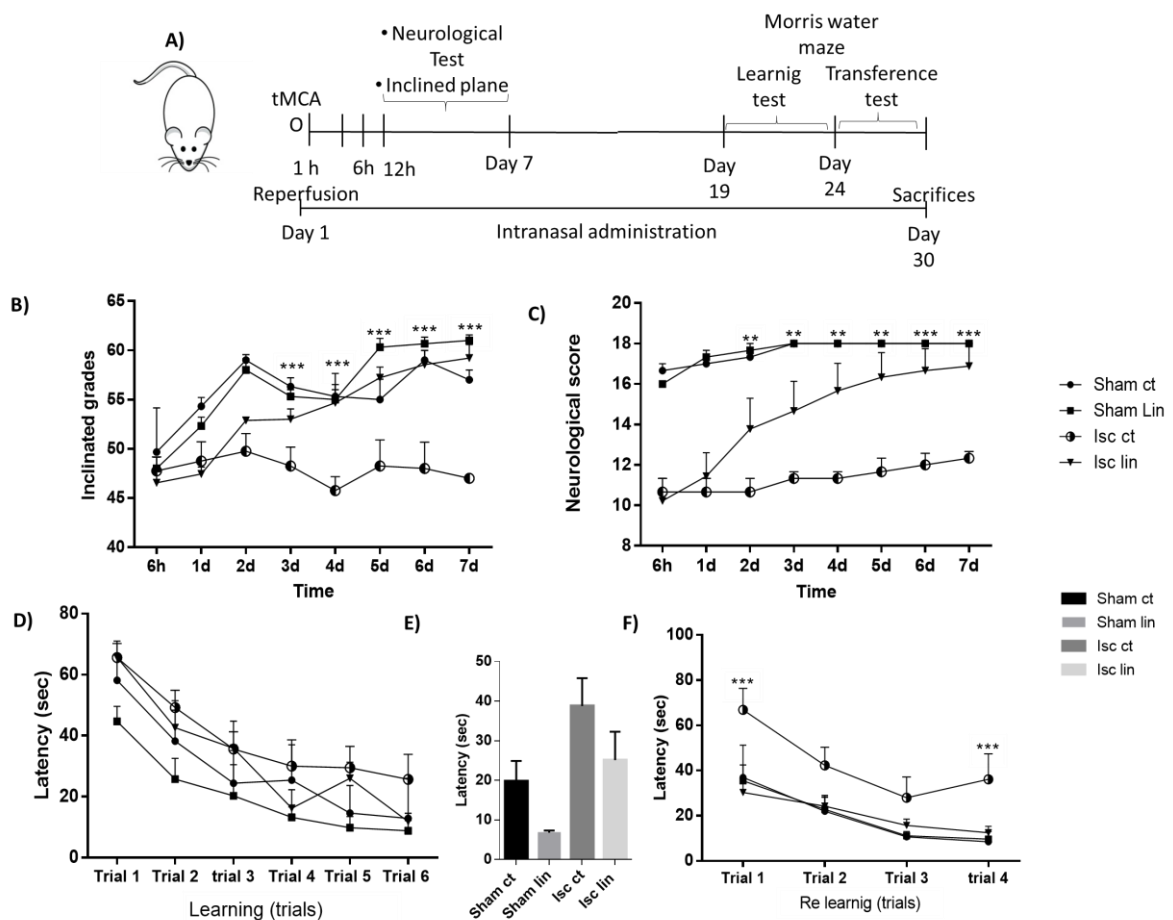


Figure 2. Neurological, motor and cognitive improvements were achieved by intranasal linalool after ischemia. A) Scheme of experimental design *in vivo* where the intranasal delivery

of linalool began at 6 hours after tMCAO or sham operations and continued for the next month. B) Inclined plane tests were performed from 6 hours after ischemia until 7 days after every 24 hours. C) In the neurological test, scores of 18 points meant the least severe cognitive impairment. D) Morris water maze test was evaluated at day 19 starting with the learning test (first position of the platform). E) Retention test after 48 hours without learning test. F) Transference test (second position of the platform). G) Cytokine profiles in serum (IL-6, IL-1 β , IL-10 and TNF α) with concentrations expressed as pg/mL. The data are expressed as the group mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n = 3-8$ animals/group. Sh ct: Sham control; sh lin: sham +linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic +linalool.

Preferential blocking of microglia activation in the cerebral cortex and hippocampus by intranasal linalool at long-term postischemia time points

Next, we determined the immunoreactivity of the astrocyte and microglial population in the cornus ammonis 1 (CA1), dentate gyrus (DG) and subiculum (Sub) of the ipsilateral hippocampus and cerebral cortex (Cx) at one month post-ischemia. The linalool treatment alone resulted in more branched astrocytes compared to the control group. Ischemia increased the GFAP staining in the soma. The staining was moderately reduced in the Cx, DG and Sub and significantly reduced in the CA1 area by linalool treatment in ischemic rats (Fig. 3A-E).

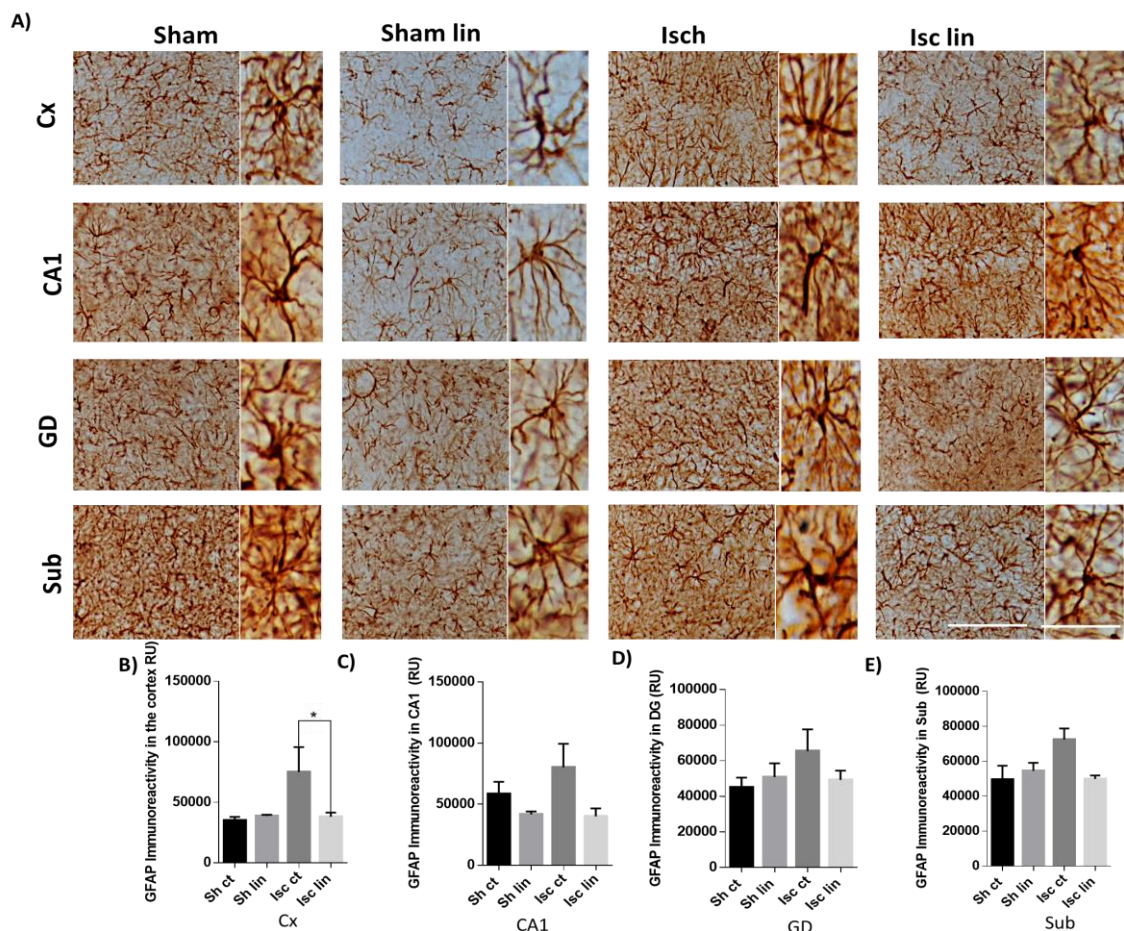


Figure 3. Intranasal linalool tends to reduce astrogliosis activation mainly in the hippocampus one month postischemia. A) Representative images of GFAP immunoreactivity. The values in the bar graphs are expressed in densitometric relative units (RU) of GFAP immunoreactivity in the B) motor cortex area, C) CA1 area, D) dentate gyrus, and E) subiculum. Sh ct: Sham control; sh lin: sham +linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic +linalool. The data are expressed as the means \pm SEM. n: 3 per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Magnification: 10x, Scale bar: 50 μ m; Insert: 40x, scale bar: 15 μ m.

However, the significant effects on the microglial population were most pronounced in the Cx and hippocampus since linalool produced a branched morphology. The ischemic animals without treatment contained ameboid-shaped microglia with higher immunoreactivity at the soma and reduced arborization. Interestingly, linalool significantly reversed active microglial cells in the Cx, CA1, DG and Sub in ischemic rats (Fig. 4A-E), supporting the reversion of the neurological and cognitive impairment and the proinflammatory state induced by ischemia on this cell population.

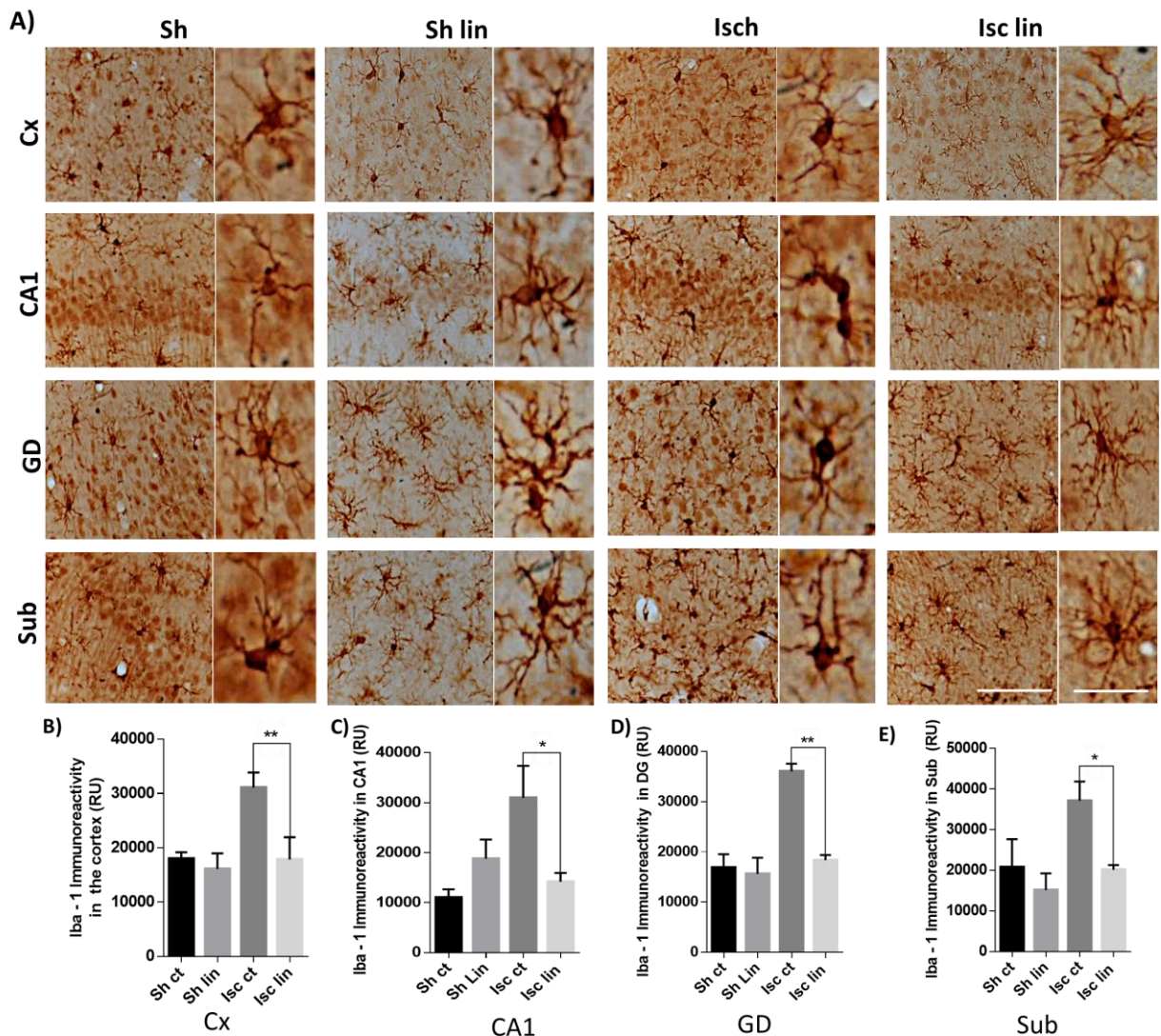


Figure 4. Intranasal linalool mainly reduced microgliosis activation in the cortex and in the hippocampus one month postischemia. A) Representative images of Iba-1 immunoreactivity

in the B) motor cortex area C) CA1 area, D) dentate gyrus, and E) subiculum. Sh ct: Sham control; sh lin: sham +linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic +linalool. The data are expressed as the means \pm SEM. n: 3 per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Magnification: 10x, Scale bar: 50 μm ; Insert: 40x, scale bar: 15 μm .

COX2 and Nrf2 were reduced in a protective context in the hippocampus of postischemic rats after intranasal linalool treatment

To confirm the anti-inflammatory action of intranasal linalool, we analyzed COX2 and Nrf2 markers of astrocyte and microglial reactivity, respectively, in the hippocampus one month postischemic stroke. COX2 immunostaining had a neuronal pattern of expression that was significantly increased in the CA1 and hilus and accompanied by astrogliosis mainly in the CA1 area (Fig. 5A, B). However, we found that Nrf2 localized in microglial cells, showing a differential distribution in response to treatment; Nrf2 had a punctate pattern in the sham groups with and without linalool, but it was aggregated in activated microglia in ischemic animals mainly at the hilus (Fig. 6A, B). In this area, reactive microglia presented a typical pro-inflammatory amoeboid morphology (Fig. 6C), which was prevented by linalool treatment under the context of less microgliosis (Fig. 6B).

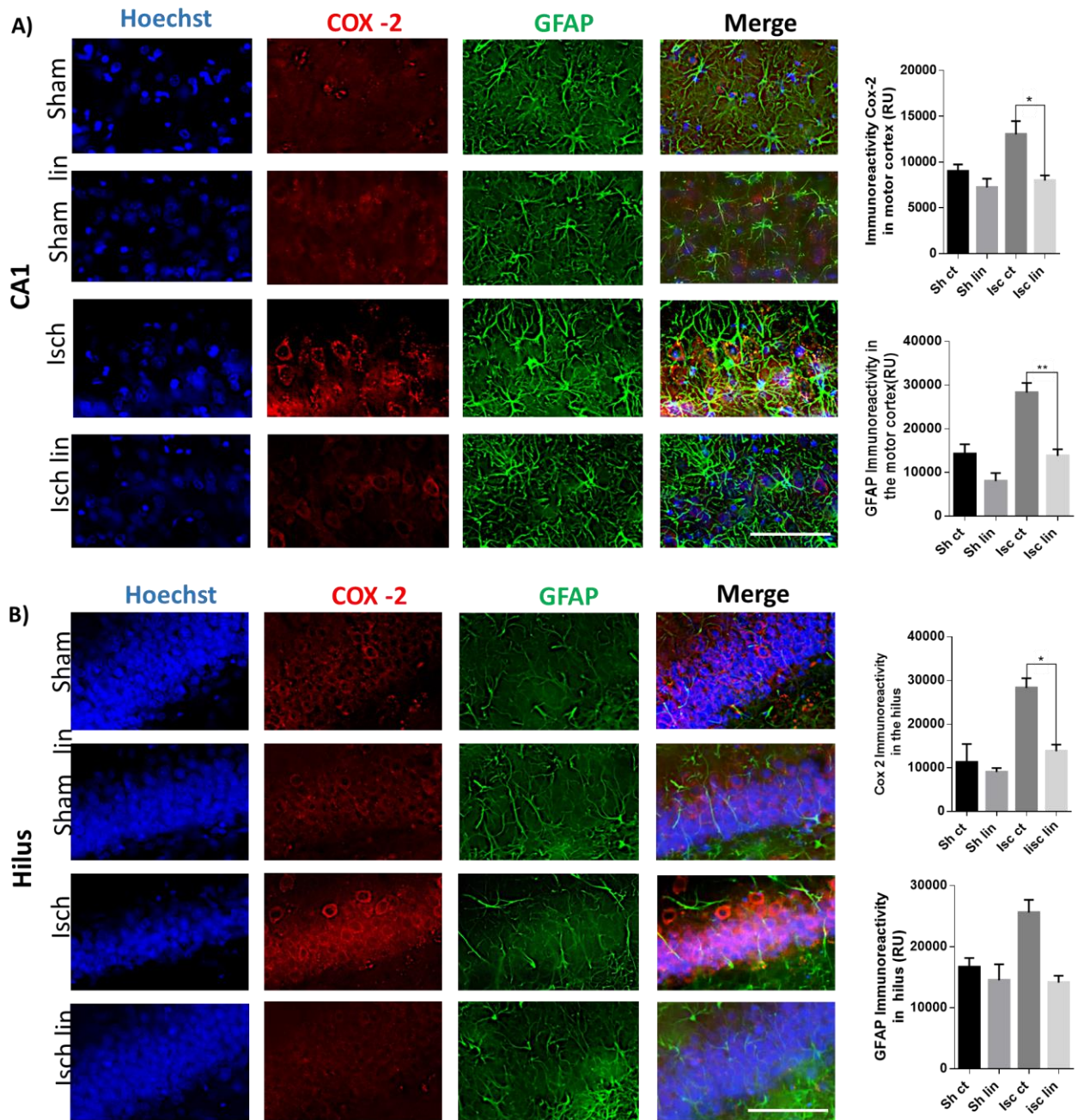


Figure 5. COX2 and astroglial markers were reduced in the hippocampus of postischemic rats.

A) Representative images of CA1 and B) hilus from the hippocampus, showing nuclei stained with Hoechst (blue), COX-2 with Alexa Fluor 594 phalloidin dye (red) and astrocytes visualized with GFAP (green). The fluorescence intensity area is expressed in densitometric relative units (RU) in the bar graphs. Sh ct: Sham control; sh lin: sham +linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic +linalool. The data are expressed as the means \pm SEM. n:3 per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Magnification: 60X, scale bar: 50 μ m.

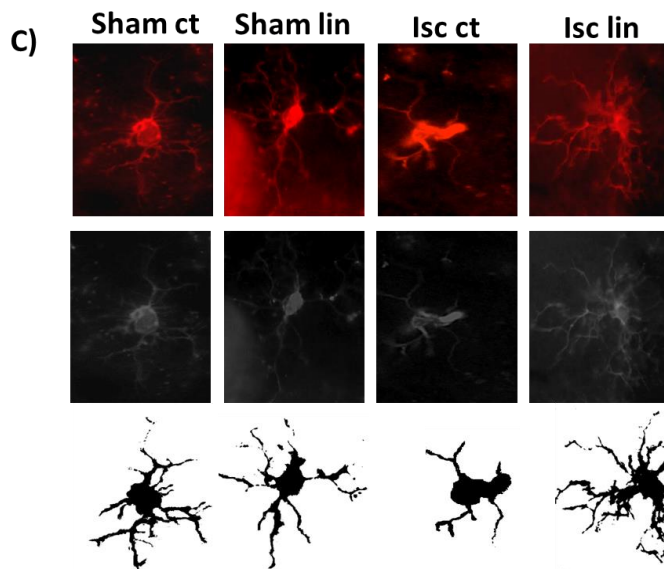
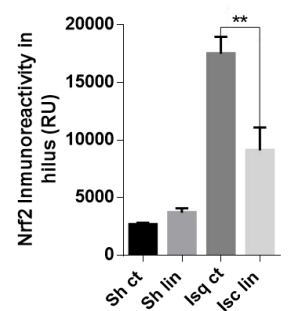
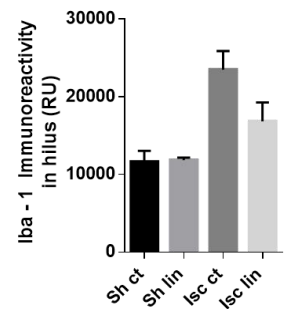
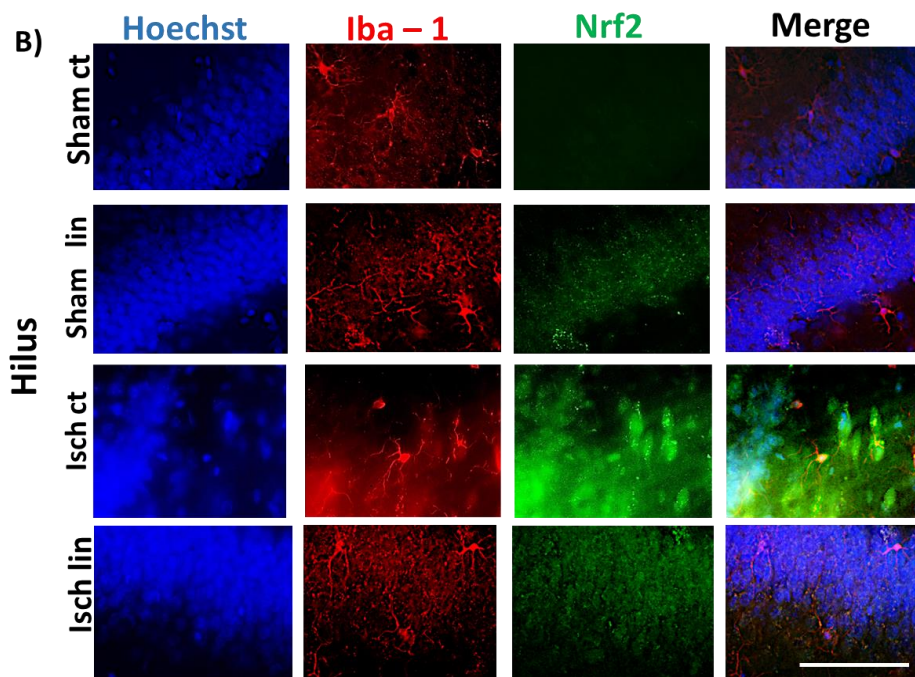
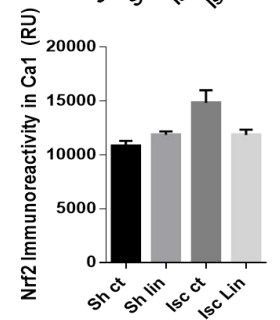
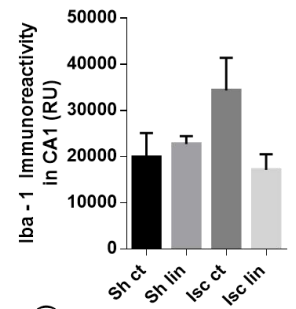
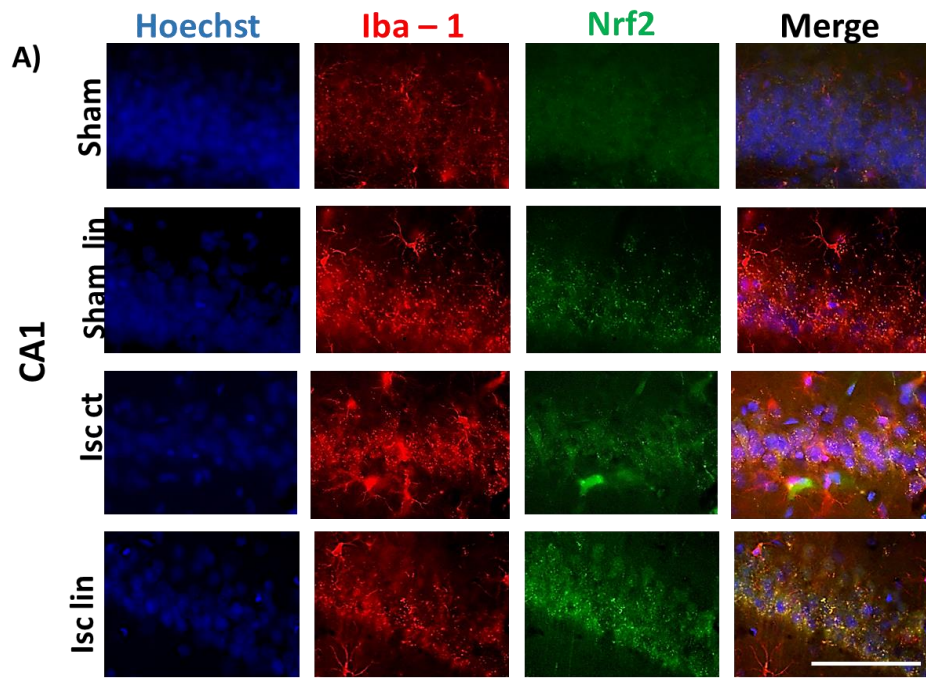


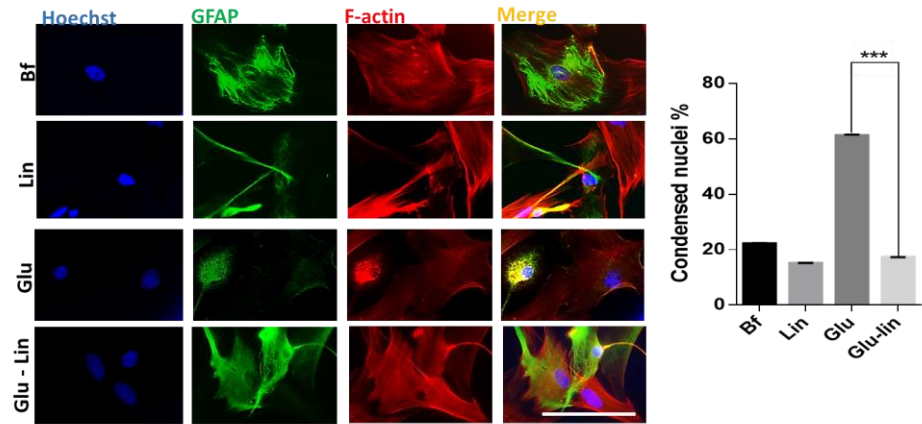
Figure 6. Nrf2 aggregates in activated microglia and is reduced by intranasal linalool in the hippocampus of postischemic rats. A) Representative images of CA1 and B) hilus from hippocampus showing nuclei stained with Hoechst (blue), Iba-1 with Alexa Fluor 594 phalloidin dye (red) and Nrf2 visualized with Alexa Fluor 488 (green). Magnification 60X. The fluorescence intensity was expressed in densitometric relative units (RU) in the bar graphs. C) Morphological characterization of microglia. Iba-1 with Alexa Fluor 594 phalloidin dye (red), black and white and binary images showing active microglia in ischemia and its reversion by linalool. Sh ct: Sham control; sh lin: sham +linalool; isch control: ischemic control; isch lin: ischemic +linalool. The data are expressed as the means \pm SEM. n:3 per group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Magnification: 60X, scale bar: 50 μ m.

Linalool promoted reduction of pro-inflammatory markers in astrocyte cultures under a gliotoxic context induced by glutamate

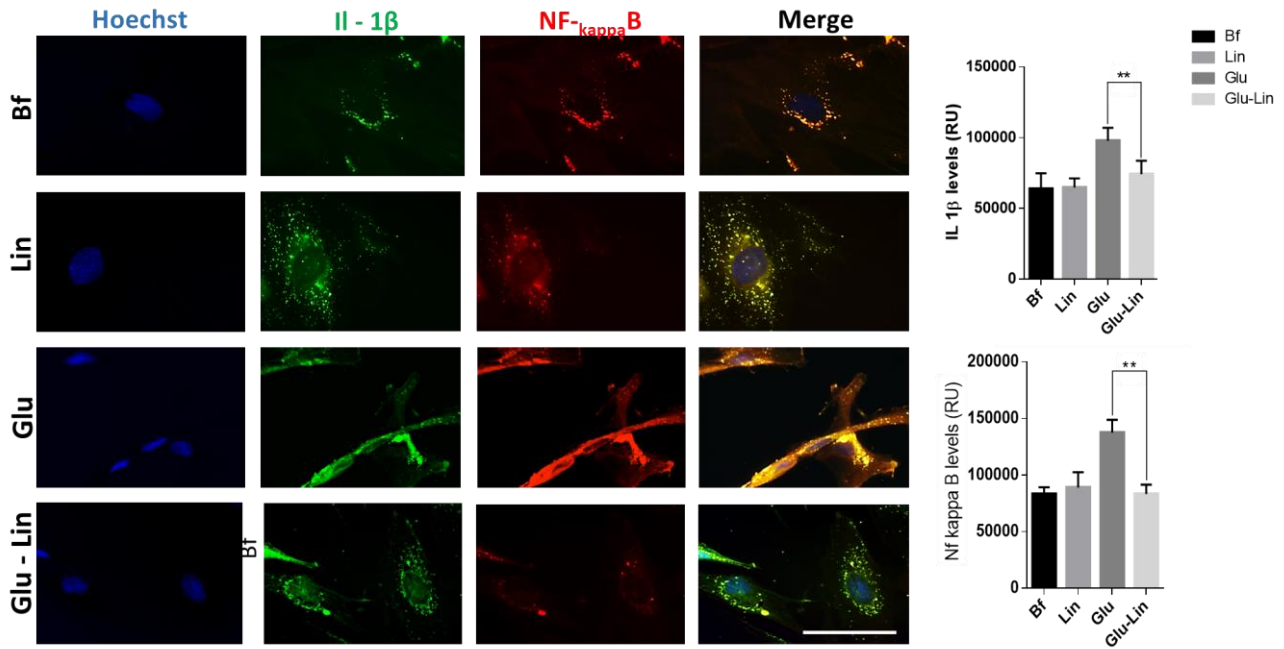
We next sought to determine the main cell population targeted by linalool under a cytotoxic context using glutamate, which is the main neurotransmitter involved in ischemia. The cells were treated for 24 h with linalool (Fig. 7A). Astrocyte cultures presented increased condensed nuclei in 62.5% of cells with a retracted actin cytoskeleton after glutamate exposure compared to the control. In the astrocyte cultures treated with glutamate and linalool, fewer cells had condensed nuclei (16.88%), and they recovered their cytoskeletal pattern but were more stellate than the control cells (Fig. 7B). The astro-protection by linalool was supported by the reduction of immunofluorescence for pro-inflammatory markers NF- κ B, IL1- β , COX2 and Nrf2 compared to the aggregated pattern and significant increased immunoreactivities under gliotoxicity (Fig. 7C, D).



B)



C)



D)

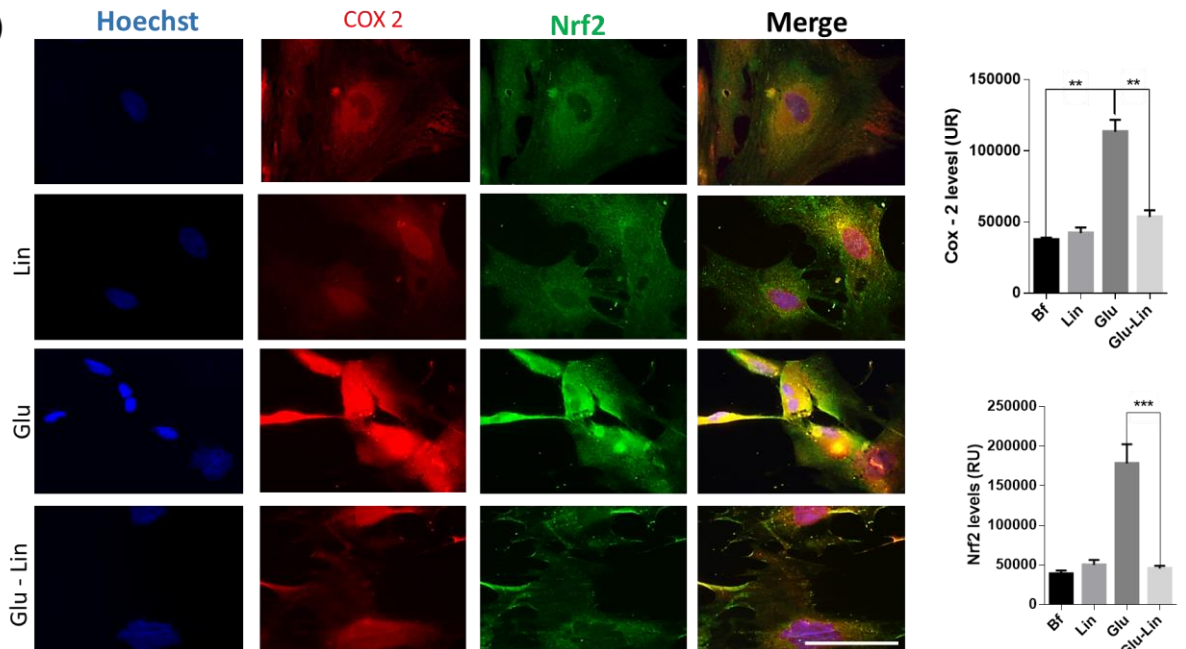


Figure 7 Linalool protects astrocytes and decrease pro-inflammatory markers under a gliotoxicity context induced by glutamate. A) Scheme of experimental design of mature astrocytes treated with glutamate at 24 DIV for 20 min and with 100 nM linalool for 24 h. B) Protection of astrocytes induced by linalool showing morphological changes of the nuclei stained with Hoechst (blue), F-actin cytoskeleton stained with Phalloidin Alexa 594 dye (red) and astrocytes with GFAP visualized with Alexa 488 dye (green). Bar graphs presenting the condensed nuclei percentage in astrocytes. The values in the bar graphs are expressed in densitometric relative units (RU) Magnification 60x, C) NF- κ B in red, IL-1 β in green and Hoechst in blue. D) Nrf2 in green and COX2 in red. Bar graphs showing the quantification of relative units of C) and D) immunofluorescences. Magnification: 60X, scale bar: 10 μ m. Data are presented as the means \pm SEM of three experiments performed in duplicate. n=3, *p<0.05 **p 0.01; ***p<0.001. ANOVA with Tukey's tests compared to the cells alone treated with glutamate.

Nrf2 had specific microglial subcellular redistribution in an anti-inflammatory environment after linalool treatment

We also assessed microglial protection by linalool in response to glutamate toxicity *in vitro* (Fig. 8A). Linalool prevented actin cytoskeleton retraction and reduced the condensed nuclei percentage from 64.56% to 29.76%; it also restored the branched microglial cells similar to the control groups (p>0.001) (Fig. 8B). Additionally, NF- κ B, IL1- β , COX2 and Nrf2 immunostaining was significantly increased in active microglia after glutamate exposure but significantly reverted by linalool treatment (Fig. 8 C, D). Linalool alone induced translocation of the Nrf2 transcription factor to the nucleus; however, Nrf2 was redistributed in dots scattered around the cytoplasm similar to a “mitochondrial disposition” (Fig. 8D, and inserts) under glutamate conditions.

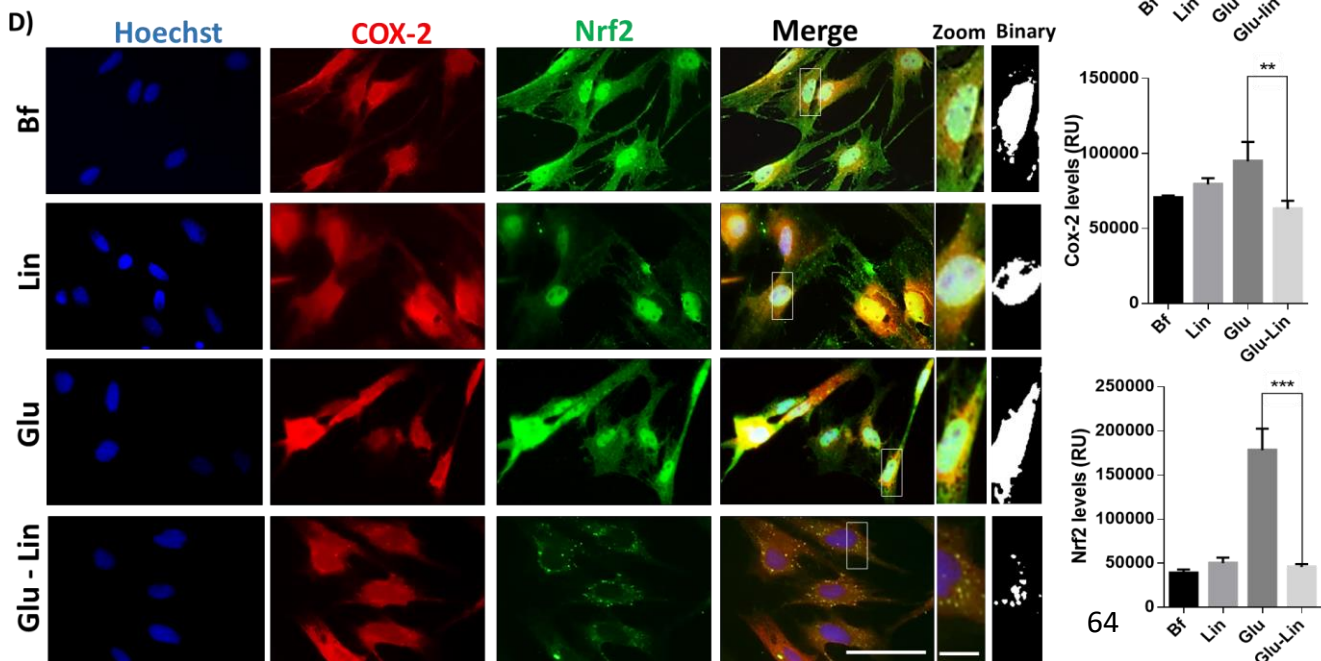
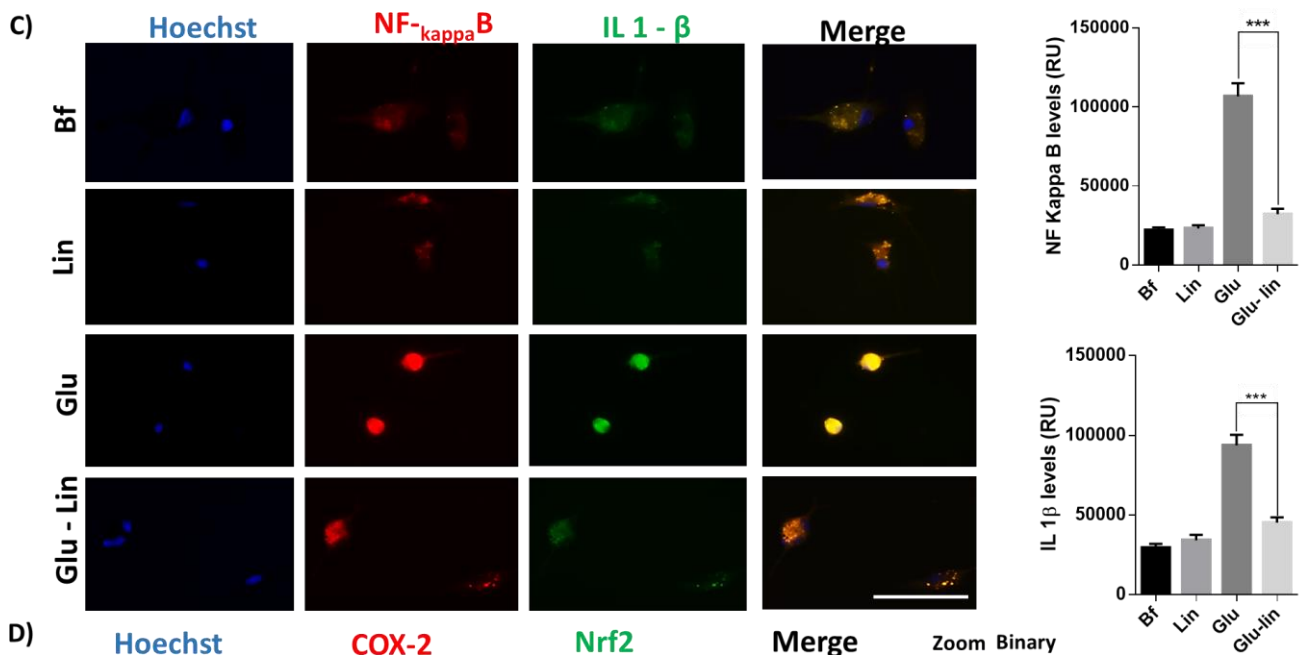
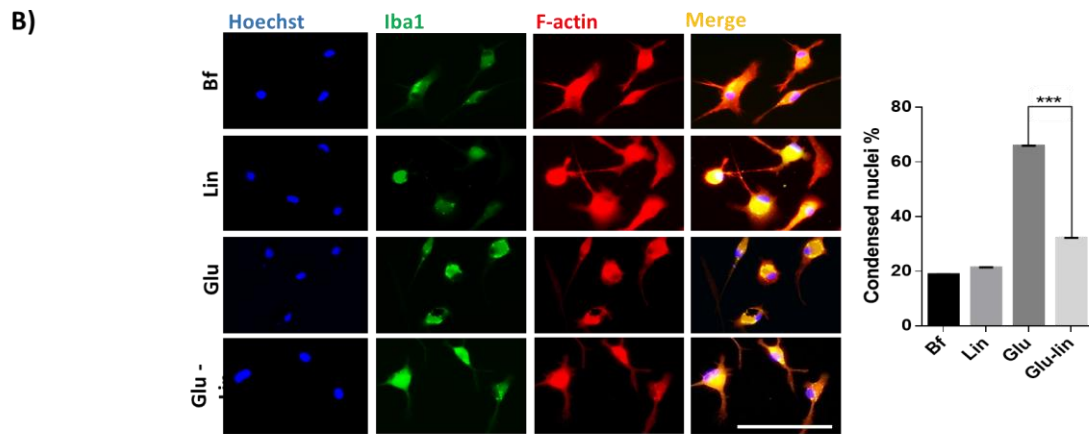
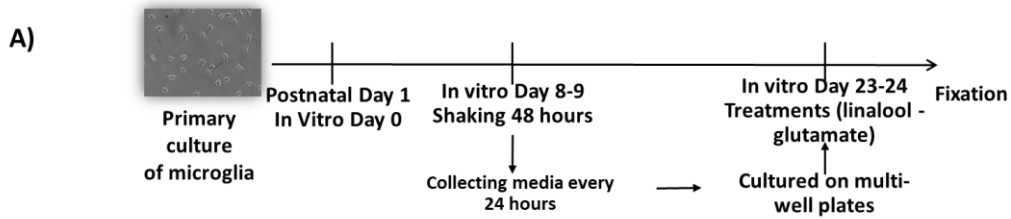


Figure 8. Linalool treatment caused Nrf2 microglial-specific subcellular redistribution in an anti-inflammatory environment and reduced NF- κ B, COX2 and IL1-Beta. A) Scheme of experimental design of the microglial culture treated with glutamate at 24 DIV for 20 min and 100 nM linalool for 24 h. B) Protection of microglia induced by linalool showing morphological changes of the nuclei stained with Hoechst (blue), F-actin cytoskeleton stained with Phalloidin Alexa 594 dye (red) and microglia with Iba-1 visualized with Alexa 488 dye (green). Bar graphs presenting the condensed nuclei percentage in microglia. The values in the bar graphs are expressed in densitometric relative units (RU). Magnification 60x, scale bar: 30 μ m. Insert: 10 μ m. C) NF- κ B in red, IL-1 β in green and Hoechst in blue. D) Nrf2 in green and COX2 in red. Bar graphs showing the quantification of relative units of C) and D) immunofluorescences. Magnification: 60X, scale bar: 30 μ m, insert: 10 μ m. Black and white and binary images showing detailed distribution of Nrf2. Data are presented as the means \pm SEM of three experiments performed in duplicate. n=3, *p<0.05 **p 0.01; ***p<0.001. ANOVA with Tukey's tests compared to the cells alone treated with glutamate.

Discussion

Our present study shows a novel approach in which daily intranasal nebulized linalool induced a local anti-inflammatory effect, supporting neurological and cognitive recovery after ischemia. It had an accentuated protective action on the microglial population, generating Nrf2 subcellular redistribution under glutamate excitotoxicity. This study complements our previous observations in which oral linalool reversed the central and peripheral pro-inflammatory phospholipidomic biomarkers in ischemic rats [27]. In addition to the previously reported antioxidant and anti-inflammatory effects of linalool [24,34,35], this work supports future studies of intranasal therapy in ischemic patients.

Intranasal administration bypasses the blood-brain barrier and directly accesses the brain via olfactory and trigeminal nerves present in the nasal mucosa [36]. Antagonists of IL-1 β and apelin-13 have reduced cell death and promoted angiogenesis after brain stroke (11, 12). However, its intranasal delivery achieved significant reduction of infarct volume from 24 h until seven days poststroke. This suggests that linalool diffuses through the membranes, such as other monoterpenes [37,38], or couples to receptors like GABA-R [39], which could block the glutamate spreading in the brain; it could also activate the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) [25,40], which are transcription factors involved in the inhibition of NF- κ B activity and cytokines (32, 33). Interestingly, linalool reduces cellular lipid accumulation and induces fatty acid oxidation [25]. These effects could be related to our recent study in which linalool specifically decreased lignoceric acid (24:0) in the ischemic hippocampus which was associated with the recovery of cognitive function[27]. This 24:0 fatty acid is a product of the peroxisome, and its detection has been associated with cardioembolic stroke and inflammation [42]

Essential oils such as lavender, which contain linalool, may have protective systemic effects through cholinergic actions [43] or through olfactory receptors [44], which could also support the neurological recovery. The inflammatory poststroke response includes the increase of pro-inflammatory cytokines, such

as interleukins, interferon-gamma and TNF α , by the immune cells. [11]. IL 1- β also plays a pivotal neurotoxic role in ischemic stroke [14,45]; and COX-2, a cyclooxygenase constitutively expressed in most cells and involved in normal physiologic functions, is highly inducible by pro-inflammatory cytokines in stroke conditions and is implicated in the metabolism of arachidonic acid to prostaglandin which produces a neuroinflammatory response [46]. Our results show that intranasal linalool decreased IL 1- β and COX-2 in both *in vivo* and *in vitro* excitotoxicity models. Others studies had reported that this monoterpene significantly reduced mechanical hypersensitivity and might reduce nociceptive behavior in response to direct administration of inflammatory mediators such as TNF α and IL 1- β [47]. Terpinolene, another monoterpene, combined with diclofenac decreased the inflammatory response associated with pain [48]. In addition, other studies have demonstrated that IL-1 β knock-down in the hippocampus significantly attenuated the memory deficit and ameliorated the oxidative and neuroinflammatory responses induced by LPS in mice [49]. Cytokines have a direct effect on blood-brain barrier function [12,13] and induce homeostatic maintenance of brain tissue after ischemic events [50]. Cytokines activate COX-2, but their reduction is associated with recovery after brain injury, decreased mortality [51], reduced infarct volume, and improvement of the neurologic deficits after ischemia [52].

Brain injury leads to activation of microglia and astrocytes, which release cytokines and chemokines [53]. These cells regulate the anti-inflammatory response and promote pro-regenerative immune phenotypes to modulate different markers to prevent chronic neuroinflammation and return to normal function [54]. Our findings showed that linalool decreased NF- κ B and Nrf2 levels one month post ischemia and after an excitotoxic event with glutamate in astrocyte and microglial cultures. NF- κ B activation in glial and immune cells mediates pathological inflammatory processes and is related with neuropathological condition. IKK2/NF- κ B signaling in forebrain neurons produces a selective inflammatory response in the dentate gyrus accompanied by decreased neuronal survival and impaired learning and memory via paracrine suppression of BDNF synthesis [55]. The inhibition of NF- κ B in astrocytes regulates pro-inflammatory and redox-activity pathways induced by ischemic injury [56] that are associated with neuroprotective effects. Several phytochemical terpenes block the NF- κ B activation [57]; for example, the terpene paeoniflorin protects against TNF α -induced cell apoptosis and neuronal loss in the ischemia-injured rats via inhibiting MAPKs/NF- κ B [58]. Pretreatment with carvacrol protects neuroblastoma cells by inhibiting Fe²⁺-induced activation of NF- κ B, expression of pro-inflammatory cytokines, and cell apoptosis [59].

Therefore, our experimental studies suggest that linalool *in vitro* and *in vivo* has anti-inflammatory actions and affects astrocytes and microglia; however, we observed a particular redistribution of Nrf2 to “mitochondria-like” compartments

in a protective and anti-inflammatory context in microglial cultures, which was also suggested in the hippocampus. Nrf2 activity is also linked with NF- κ B [60] through a cross-talk modulation of the RAC1 inflammatory pathway [61]. Otherwise, GTS21 activates α 7 nAChR and blocks the inflammatory effect through inhibition of the NF- κ B pathway. It also upregulates canonical Nrf2 antioxidant genes and proteins in astrocytes, reduces neuronal apoptosis, and reduces NF- κ B activity and pro-inflammatory cytokines in an *in vivo* LPS-induced neuroinflammation model [62].

In a model of cerebral brain stroke in mice, artesunate, an activator of Nrf2, regulates the transcriptional signaling, improves cognitive and motor impairment, decreases infarct volume and mediates the anti-inflammatory signals 22 hours after reperfusion [63]. Nrf2 also has cytoprotective roles via activation of the pentose phosphate pathway (PPP), reduction of oxidative stress by glutathione peroxidase in an *in vitro* model, and induction of nuclear translocation of Nrf2 in the presence of microglia [64]. In our study, Nrf2 showed nuclear translocation after linalool treatment specifically in microglia, and it had a widespread dotted pattern under glutamate toxicity which was also suggested *in vivo*. This widespread pattern has been previously reported in cardiomyocytes, revealing the association of the transcriptional factor with the outer mitochondrial membrane in which Nrf2 protects mitochondria from oxidative injury through its direct interaction with the organelle [65]. Other studies have revealed effects of linalool on mitochondrial function. In a model of UVB radiation in skin human cells, linalool resulted in accumulation of rhodamine-123 in polarized mitochondria, and TNF- α , IL6, IL-10, MMP-2 and MMP-9 were modulated by linalool treatment and protected the human skin cells from oxidative damages and modulated MAPK and NF- κ B signaling [66].

Acute response after brain ischemia is modulated by microglia [45], and these cells can change or maintain their phenotype to protect the brain tissue [67]. Inhibiting the aberrant activation of microglia may have therapeutic potential after ischemic stroke [68,69]. The excitotoxic events after brain ischemia change the cholinergic, purinergic and glutamatergic receptors; responses and have been proposed as therapeutic options in stroke [70–72]. The microglia cells have neurotransmitter receptors for GABA, ATP, adenosine, glutamate, adrenaline and dopamine and can respond to them by adopting a range of immune phenotypes [73]. Our results showed an “M2-like phenotype” of microglia after linalool treatment in both *in vivo* and *in vitro* models. This phenotype is implicated in the anti-inflammatory response because the “M1-like phenotype” is the common state of the cells during acute injury, and they gradually switch toward the M2 homeostatic state [67]. The phenotypic changes in these cells could be related to the modulation of receptors by the response of microglia cells after treatment in the control of excitotoxic events. Different terpenes of natural plants modulate the glutamatergic, serotonergic and GABAergic systems

[74,75]. Other studies have shown how changes in the morphology of microglia are related with calcium-dependent stretch/swelling-activated processes, representing a key ability of microglia to monitor the brain parenchyma and the possibility of influencing neuronal activity [76].

In summary, our results showed a local anti-inflammatory action and microglial activity in response to linalool in the resolution of pathological ischemic events in both *in vivo* as *in vitro* models. Linalool achieved homeostasis of the brain parenchyma and helped restore neurological and cognitive function. It is known that activated microglia induce astrocyte reactivity [77–79], modulate neuronal plasticity [80,81] and influence blood-brain barrier function [82]. We found that microglia stimulated with linalool respond to the excitotoxic events by changing their morphology from M1 and preserving an “M2-like phenotype”, reducing the proinflammatory markers IL-1 β and COX-2 and the transcription factor NF- κ B and regulating Nrf2 translocation to exert its anti-inflammatory action [83]. Additionally, linalool acted quickly on the brain after intranasal delivery, validating the proof-of-concept of the effective protection of intranasal linalool in ischemic rats. With complementary future studies, this could potentially be translated to a human stroke treatment that acts in a narrow therapeutic window.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments:

The authors thank Tania Marquez Durango from GNA for her expert veterinarian support and Catalina Agudelo and Ana María Ramirez from GISB for their technical assistance in the bioavailability assay. Both groups are from the University of Antioquia. This research was supported by a grant from CODI # 2015- 6890 University of Antioquia.

References

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England) 2014;383:245–54.
2. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2009. p. 355–69.
3. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 2006;26:1057–83.
4. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralt A, Shah SB, et

- al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*. Springer US; 2017;37:571–85.
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M a. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. 4441. *Trends Neurosci*. 1999;22:391–7.
6. Gardener H, Wright CB, Rundek T, Sacco RL. Brain health and shared risk factors for dementia and stroke. *Nat. Rev. Neurol*. 2015. p. 651–7.
7. Chandra A, Stone C, Du X, Li W, Huber M, Bremer R, et al. The cerebral circulation and cerebrovascular disease III: Stroke. *Brain Circ*. 2017;3:66–77.
8. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55:310–8.
9. Li W, Yang S. Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circ* . 2016;2:153.
10. Palmela, Inês (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Lisbon, Lisbon P, Brites, Dora (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Lisbon, Lisbon P, Brito, Maria Alexandra (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Department of Biochemistry and Cell Biology, University of Lisbon, Lisbon P. Blood-brain barrier in health and disease. *Adv Med Biol Vol 35*. 2012. p. 201–18.
11. Arumugam T V., Granger DN, Mattson MP. Stroke and T-cells. *NeuroMolecular Med*. 2005. p. 229–42.
12. Rochfort KD, Cummins PM. The blood–brain barrier endothelium: a target for pro-inflammatory cytokines: Figure 1. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:702–6.
13. W. P, K.P. S, H. H, V.K. M, Y. Z. Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function [Internet]. *Curr. Pharm. Des*. 2011. p. 3729–40.
14. Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation*. 2008;5.
15. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. Elsevier B.V.; 2012;64:614–28.
16. Lee JH, Kam EH, Kim JM, Kim SY, Kim EJ, Cheon SY, et al. Intranasal Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist in a Transient Focal Cerebral Ischemia Rat Model. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25:149–57.
17. Chen D, Lee J, Gu X, Wei L, Yu SP. Intranasal delivery of apelin-13 is neuroprotective and promotes angiogenesis after ischemic stroke in mice. *ASN Neuro*. 2015;7.
18. Brabazon F, Wilson CM, Jaiswal S, Reed J, Frey WH, Byrnes KR. Intranasal

insulin treatment of an experimental model of moderate traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;0271678X1668510.

19. Rodriguez M, Lapierre J, Ojha CR, Kaushik A, Batrakova E, Kashanchi F, et al. Intranasal drug delivery of small interfering RNA targeting Beclin1 encapsulated with polyethylenimine (PEI) in mouse brain to achieve HIV attenuation. *Sci Rep.* 2017;7.

20. Kim ID, Shin JH, Kim SW, Choi S, Ahn J, Han PL, et al. Intranasal delivery of HMGB1 siRNA confers target gene knockdown and robust neuroprotection in the postischemic brain. *Mol Ther.* 2012;20:829–39.

21. Bi CC, Wang AP, Chu YC, Liu S, Mu HJ, Liu WH, et al. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:6547–59.

22. Del Zoppo GJ. Plasminogen activators and ischemic stroke: Conditions for acute delivery. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39:406–25.

23. Cipolla MJ, Lessov N, Clark WM. Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2000;31:940–5.

24. Park H, Seol GH, Ryu S, Choi IY. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. *Arch Pharm Res. Pharmaceutical Society of Korea;* 2016;39:555–64.

25. Jun H-J, Lee J-H, Kim J, Jia Y, Kim KH, Hwang KY, et al. Aromatic terpenoid linalool is an agonistic ligand for {PPAR α } that reduces plasma triglyceride levels and rewires the hepatic transcriptome and plasma metabolome. *J Lipid Res.* 2014;55:1098–110.

26. Sabogal-Guáqueta AM, Osorio E, Cardona-Gómez GP. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. *Neuropharmacology.* 2016;102:111–20.

27. Sabogal-Guáqueta AM, Posada-Duque R, Cortes NC, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. *Neuropharmacology.* 2018;135:555–71.

28. Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol.* 2015;38:162–6.

29. Gutiérrez-Vargas JA, Múnera A, Cardona-Gómez GP. CDK5 knockdown prevents hippocampal degeneration and cognitive dysfunction produced by cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35:1937–49.

30. Garcia JH, Wagner S, Liu K-F, Hu X -j. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: Statistical Validation. *Stroke.* 1995;26:627–35.

31. Koc ER, Gökce EC, Sönmez MA, Namuslu M, Gökce A, Bodur AS. Borax partially prevents neurologic disability and oxidative stress in experimental spinal cord ischemia/reperfusion injury. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24:83–90.
32. Becerra-Calixto A, Cardona-Gómez GP. Neuroprotection Induced by Transplanted CDK5 Knockdown Astrocytes in Global Cerebral Ischemic Rats. *Mol Neurobiol.* 2017;54:6681–96.
33. Paxinos G, Watson C. *Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [Internet]. Sydney; New York Acad. Press. 1986.
34. Seol G-H, Kang P, Lee HS, Seol GH. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. *BMC Neurol. BMC Neurology;* 2016;16:4–9.
35. Li Y, Lv O, Zhou F, Li Q, Wu Z, Zheng Y. Linalool Inhibits LPS-Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells by Activating Nrf2. *Neurochem Res.* 2015;40:1520–5.
36. Lochhead JJ, Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration. *J Cereb Blood Flow Meta.* Nature Publishing Group; 2015;35:371–81.
37. Yin Q, Shi X, Ding H, Dai X, Wan G, Qiao Y. Interactions of borneol with DPPC phospholipid membranes: A molecular dynamics simulation study. *Int J Mol Sci.* 2014;15:20365–81.
38. Ceschel GC, Maffei P, Moretti MDL, Demontis S, Peana AT. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of *Salvia desoleana* Atzei and Picci essential oil from topical formulations. *Int J Pharm.* 2000;195:171–7.
39. Milanos S, Elsharif SA, Janzen D, Buettner A, Villmann C. Metabolic Products of Linalool and Modulation of GABAA Receptors. *Front Chem.* 2017;5.
40. Cheng BH, Sheen LY, Chang ST. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice. *J Tradit Complement Med.* Elsevier Ltd; 2015;5:27–34.
41. Stahel PF, Smith WR, Bruchis J, Rabb CH. Peroxisome proliferator-activated receptors: “Key” regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. *PPAR Res.* 2008.
42. Chung HK, Cho Y, Do HJ, Oh K, Seo WK, Shin MJ. Plasma phospholipid arachidonic acid and lignoceric acid are associated with the risk of cardioembolic stroke. *Nutr Res.* 2015;35:1001–8.
43. Koulivand PH, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A. Lavender and the nervous system. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013.
44. Tsuji T, Tanaka S, Bakhshishayan S, Kogo M, Yamamoto T. Olfactory stimulation modulates the blood glucose level in rats. *Int J Med Sci.* 2018;15:269–73.
45. Wendeln A-C, Degenhardt K, Kaurani L, Gertig M, Ulas T, Jain G, et al. Innate

immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks. *Nature*. 2018;556:332–8.

46. Huang H, Al-Shabrawey M, Wang MH. Cyclooxygenase- and cytochrome P450-derived eicosanoids in stroke. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2016. p. 45–53.

47. Batista PA, De Paula Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, Da Silva Brum LF, et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain*. Elsevier Ltd; 2010;11:1222–9.

48. Macedo EMA, Santos WC, Sousa Neto BP, Lopes EM, Piauilino CA, Cunha FVM, et al. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. *Brazilian J Med Biol Res*. 2016;49.

49. Li M, Li C, Yu H, Cai X, Shen X, Sun X, et al. Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice. *J Neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation*; 2017;14:1–12.

50. Patra A, Chen X, Sadowska GB, Zhang J, Lim YP, Padbury JF, et al. Neutralizing anti-interleukin-1 β antibodies reduce ischemia-related interleukin-1 β transport across the blood–brain barrier in fetal sheep. *Neuroscience*. 2017;346:113–25.

51. Zuloaga KL, O'Connor DT, Handa RJ, Gonzales RJ. Estrogen receptor beta dependent attenuation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 by androgens in human brain vascular smooth muscle cells and rat mesenteric arteries. *Steroids*. 2012;77:835–44.

52. Sugimoto K, Iadecola C. Delayed effect of administration of COX-2 inhibitor in mice with acute cerebral ischemia. *Brain Res*. 2003;960:273–6.

53. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol*. 2015;72:355–62.

54. Simon DW, McGeachy MJ, Baylir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol*. 2017. p. 171–91.

55. Maqbool A, Lattke M, Wirth T, Baumann B. Sustained, neuron-specific IKK/NF- κ B activation generates a selective neuroinflammatory response promoting local neurodegeneration with aging. *Mol Neurodegener*. 2013;8:1–18.

56. Dvorianchikova G, Barakat D, Brambilla R, Agudelo C, Hernandez E, Bethea JR, et al. Inactivation of astroglial NF- κ B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci*. 2009;30:175–85.

57. Yang CH, Yen TL, Hsu CY, Thomas PA, Sheu JR, Jayakumar T. Multi-targeting andrographolide, a novel NF- κ B inhibitor, as a potential therapeutic agent for stroke. *Int. J. Mol. Sci*. 2017.

58. Guo RB, Wang GF, Zhao AP, Gu J, Sun XL, Hu G. Paeoniflorin Protects against Ischemia-Induced Brain Damages in Rats via Inhibiting MAPKs/NF- κ B-Mediated Inflammatory Responses. *PLoS One*. 2012;7.
59. Cui ZW, Xie ZX, Wang BF, Zhong ZH, Chen XY, Sun YH, et al. Carvacrol protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against Fe²⁺-induced apoptosis by suppressing activation of MAPK/JNK-NF- κ B signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*. Nature Publishing Group; 2015;36:1426–36.
60. Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:1649–63.
61. Cuadrado A, Martín-Moldes Z, Ye J, Lastres-Becker I. Transcription factors NRF2 and NF- κ B are coordinated effectors of the rho family, GTP-binding protein RAC1 during Inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289:15244–58.
62. Patel H, McIntire J, Ryan S, Dunah A, Loring R. Anti-inflammatory effects of astroglial α 7 nicotinic acetylcholine receptors are mediated by inhibition of the NF-KB pathway and activation of the Nrf2 pathway. *J Neuroinflammation*. 2017;14.
63. Lu H, Wang B, Cui N, Zhang Y. Artesunate suppresses oxidative and inflammatory processes by activating Nrf2 and ROS-dependent p38 MAPK and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2018;17:6639–46.
64. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, et al. A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J Neuroinflammation* [Internet]. *Journal of Neuroinflammation*; 2016;13:1–20.
65. Strom J, Xu B, Tian X, Chen QM. Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress. *FASEB J*. 2016;30:66–80.
66. Gunaseelan S, Balupillai A, Govindasamy K, Ramasamy K, Muthusamy G, Shanmugam M, et al. Linalool prevents oxidative stress activated protein kinases in single UVB-exposed human skin cells. *PLoS One*. 2017;12.
67. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012;43:3063–70.
68. Luo XG, Chen S Di. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Transl. Neurodegener*. 2012.
69. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 2015;138:1138–59.
70. Nikonenko I, Jones EV, Fiumelli H, Bernardinelli Y. Glia and the synapse: Plasticity and disease. *Neural Plast*. 2014;2014.
71. Martín A, Domercq M, Matute C. Inflammation in stroke: the role of cholinergic, purinergic and glutamatergic signaling. *Ther Adv Neurol Disord*.

2018;11:175628641877426.

72. Mongin AA. Disruption of ionic and cell volume homeostasis in cerebral ischemia: The perfect storm. *Pathophysiology*. 2007;14:183–93.

73. Lee M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci [Internet]*. 2013;14:21–32.

74. Zhang J, Zhang Z, Zhang W, Li X, Wu T, Li T, et al. Jia-Jian-Di-Huang-Yin-Zi decoction exerts neuroprotective effects on dopaminergic neurons and their microenvironment. *Sci Rep*. 2018;8.

75. Mendiguren A, Aostri E, Pineda J. Regulation of noradrenergic and serotonergic systems by cannabinoids: relevance to cannabinoid-induced effects. *Life Sci*. 2018. p. 115–27.

76. Murana E, Pagani F, Basilico B, Sundukova M, Batti L, Di Angelantonio S, et al. ATP release during cell swelling activates a Ca²⁺-dependent Cl⁻ Current by autocrine mechanism in mouse hippocampal microglia. *Sci Rep*. Springer US; 2017;7:1–16.

77. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS, et al. Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med*. 2018;24:931–8.

78. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541:481–7.

79. Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115:E1896–905.

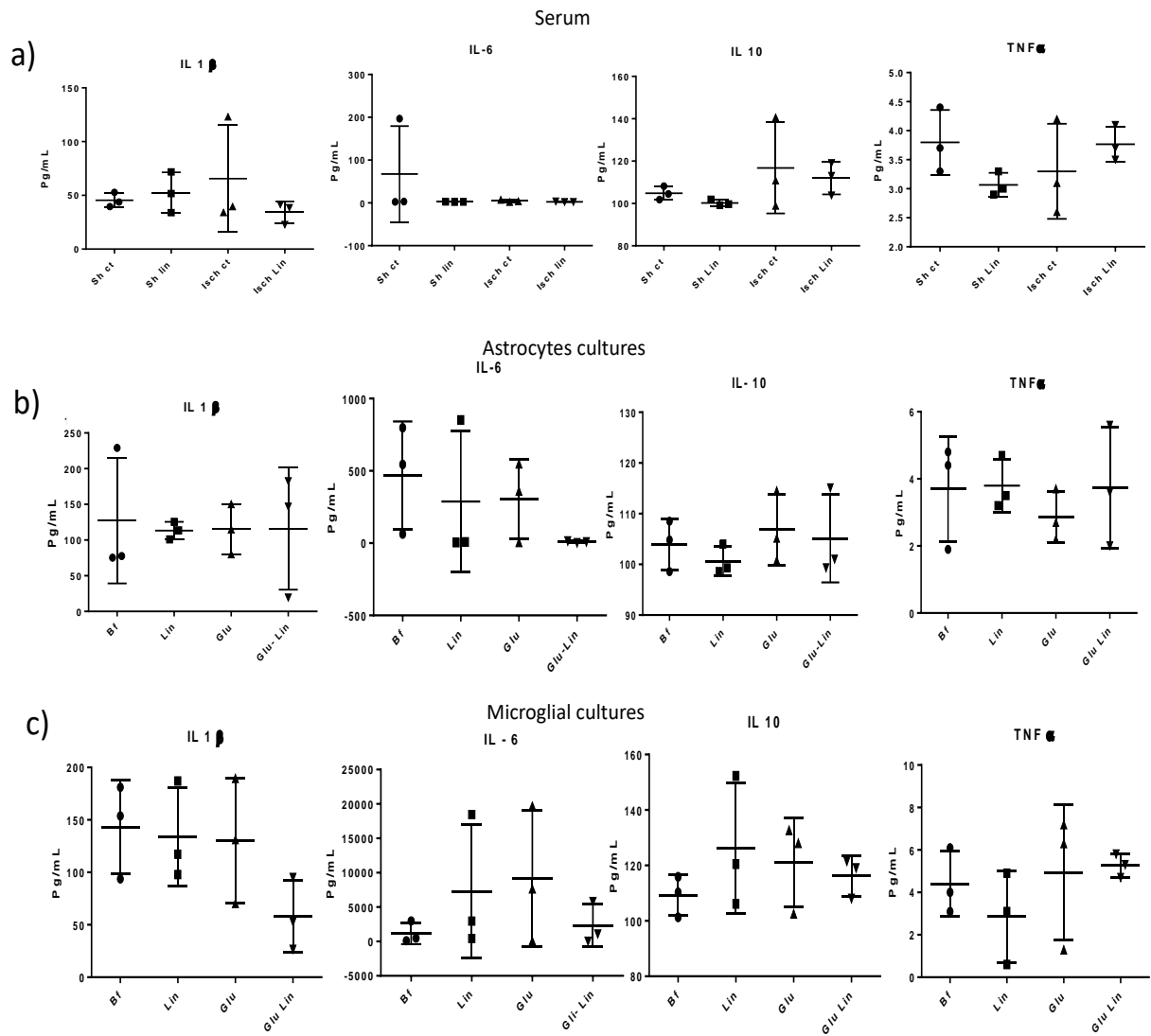
80. Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*. 2009. p. 1030–8.

81. McKenzie AT, Wang M, Hauberg ME, Fullard JF, Kozlenkov A, Keenan A, et al. Microglial clearance function in health and disease. *Sci Rep* 2018;8:8868.

82. Lécuyer MA, Kebir H, Prat A. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016;1862:472–82.

83. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun*. 2016;7.

Supplementary data



Supplementary figure 1. Cytokine profile after *in vivo* and *in vitro* linalool treatment. A) IL-1Beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha were detected by multiplex assays in the serum of ischemic rats treated with linalool. B) IL-1Beta, IL-6, IL-10 and TNF-alpha detected in the supernatants of astrocytes and c) microglia treated with 125 μ M glutamate with and without 100 nM linalool. Values are presented as concentration expressed as pg/mL.

Capítulo III
Discusión general

Discusión general

El tratamiento intranasal con linalool en el modelo *in vivo* mostró resultados novedosos asociados con la actividad neuroprotectora de la molécula, dentro de los cambios generados están la disminución del volumen de infarto 24 horas y 7 días post isquemia, la recuperación neurológica, motora y cognitiva, y la disminución de marcadores asociados con la respuesta inflamatoria como COX-2, sumado a la disminución del fenotipo activado de la microglia y la redistribución de Nrf2 observados en corteza y diferentes zonas del hipocampo que en conjunto apoyan el efecto protector de la molécula inhalada. Previamente se ha descrito que Nrf2 participa en la adquisición final del fenotipo microglial, debido a que en ratones deficientes de Nrf2 son hipersensibles a la neuroinflamación inducida por LPS con un aumento en los marcadores típicos de microglia reactiva en el hipocampo [1], resultado que se corresponde con los hallazgos que muestran que células microgliales con una alta expresión de la enzima antioxidante HO-1, se asocian con el fenotipo no reactivo implicado en la resolución de la inflamación después de una lesión cerebral traumática [2], apoyando lo observado en el presente estudio sobre la recuperación observada en los animales isquémicos tratados con el linalool vía intranasal. Además, otros estudios mencionan que la resolución de la respuesta inflamatoria recupera la función motora y neurológica después de un evento cerebral traumático [3] [4]. Los terpenos como el linalool han mostrado capacidad para mediar este tipo de respuestas y disminuir los efectos de la lesión. También, los endocannabinoides que pertenece a este grupo de sustancias químicas, es conocido por amplio espectro de propiedades biológicas y sus implicaciones en mecanismos celulares y moleculares implicados en la protección de la función cognitiva [5].

Varios estudios han descrito la actividad de los monoterpenos a través de vías de señalización que recuperando la homeostasis celular. Entre ellas se encuentra la activación de la ruta de supervivencia Akt que media las respuestas endógenas al estrés neuronal inducidas por eventos excitotóxicos, como los inducidos por un evento isquémico [6], cuando un compuesto favorece la fosforilación en los residuos de serina / treonina que son el blanco principal cascada abajo del fosfatidilinositol 3 - quinasa (PI3K) promueve la supervivencia celular mediante la fosforilación e inhibición de varias proteínas dentro de las que se incluyen: Bad, caspasa-9 y la glucógeno sintasa 3- quinasa-(GSK-3) y de esta manera media la supervivencia neuronal. Otro de los mecanismos celulares presentes en un evento isquémico es la activación excesiva de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) un subtipo de receptores de glutamato, que conducen a un influjo anormal de calcio a través de canales catiónicos asociados al receptor, los cuales contribuyen en procesos de muerte neuronal mediados por la excitotoxicidad con glutamato [7]. El aumento de calcio intracelular desencadena una sobrecarga de calcio mitocondrial y dicha disfunción es traducida en la producción de especies reactivas de oxígeno generan pérdida neuronal [8], y se activa la calpaína I, implicada en fenómenos de muerte

excitotóxica [9]. La propiedad para responder de manera protectora frente a estos eventos excitotóxicos a nivel neuronal ha sido descrita para extractos de plantas en cuyo contenido de metabolitos poseen concentraciones de linalool [10].

Un ejemplo de ello es la actividad neuroprotectora del aceite esencial de Bergamota cuya acción protege de la muerte neuronal inducida por NMDA y sus efectos sobre la actividad de las proteínas fosfatasa en condiciones *in vitro*, ya que reduce la desactivación de Akt causada por la activación de los receptores NMDA. Así, este aceite esencial previene también la acumulación de calpaína favoreciendo la neuroprotección. Además, un tratamiento previo con el aceite esencial en cultivos celulares impide la acumulación de ROS intracelulares, estos resultados sugieren que los monoterpenos presentes en el aceite esencial de Bergamota interacciona con diversas vías de muerte celular provocadas por la alteración de la homeostasis celular y el influjo de calcio inducido por excitotoxinas [8].

El aumento del estrés oxidativo después de un evento isquémico puede dar lugar a procesos secundarios, tales como la sobre-expresión de mediadores inflamatorios, la activación de la microglia y la estimulación de la proliferación de astrocitos, que a su vez puede aumentar aún más la generación de ROS [11]. Se ha demostrado que la administración del extracto de *L. angustifolia* una planta con alto contenido de linalool puede aliviar la acumulación extracelular de glutamato y disminuir el estrés oxidativo. El mecanismo de acción neuroprotector de monoterpenos como el linalool se basa en la combinación de sus propiedades neuroprotectoras y neurotróficas. La neuroprotección puede preservar la función neurológica mediante el mantenimiento de la función axonal y la prevención de la muerte celular [12].

Otro posible mecanismo de acción neuroprotector del linalool puede atribuirse a su capacidad de funcionar como agonista de PPAR α , un receptor nuclear activado por ligandos que regula la concentración de triglicéridos en plasma. Un estudio demostró los efectos hipotrigliceridémicos del linalool gracias a sus propiedades agonistas de PPAR α , resultado confirmado a través de experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* donde se evidenció una disminución significativa de los niveles plasmáticos de metabolitos de los ácidos grasos, tales como el ácido láurico, ácido palmítico y ácido mirístico en ratones tratados con linalool [13,14]. Se ha demostrado, que un desbalance en el metabolismo de los lípidos puede ser de particular importancia para las lesiones y trastornos del sistema nervioso central (SNC), ya que la acumulación de lípidos en las paredes arteriales puede aumentar el riesgo de accidente cerebrovascular y desencadenar la activación de citoquinas pro inflamatorias y de lipoproteínas implicadas en la inflamación. La alteración del metabolismo de lípidos puede también estimular la producción de eicosanoides, ceramidas, y de especies reactivas que potencian las lesiones del SNC y otros trastornos neurológicos

[15,16]. Lo cual apoya nuestros previos estudios, sobre el cambio en el perfil lipídico de animales isquémicos tratados con linalool, la disminución de la astrogliosis y de COX-2 [17], y de manera muy particular la reducción ácido lignocérico, altamente asociado con daño en la función del peroxisoma.

Por lo tanto, las propiedades biológicas de los terpenoides los convierten en candidatos muy prometedores para el tratamiento de muchas patologías, sin embargo, hay vacíos acerca de su funcionalidad. Particularmente, el linalool cuenta con una amplia gama de propiedades benéficas las cuales se hace necesario explorar y caracterizar más a fondo para así potenciar su uso como agente terapéutico. Dentro de sus propiedades encontramos mecanismos de acción como su participación en la modulación del flujo iónico, la inflamación, su capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, antinociceptiva, y ansiolítica, propiedades que permiten considerarlo como una molécula capaz de atenuar procesos biológicos involucrados en neurodegeneración, su capacidad para inhibir las especies reactivas de oxígeno, bloquear la apoptosis, modular las respuestas inflamatorias.

No obstante, el abordaje de nuestra investigación a través de la administración intranasal y el efecto protector es novedoso, ya que logró una reducción significativa del volumen del infarto desde las 24 horas hasta siete días después del accidente cerebrovascular, lo que sugiere una difusión a través de las membranas, como lo demuestran otros estudios con monoterpenos [[18,19], o su acoplamiento a receptores como GABA-R [20] pudiendo bloquear la propagación del glutamato en el cerebro; y también la activación de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) [21]. Además se ha demostrado la actividad de estas moléculas en la inhibición de factores de transcripción como NF- κ B y las citoquinas [22]

Preferencia del linalool por la acción sobre la microglia

Nuestros resultados muestran un efecto notable del tratamiento con linalool sobre la población de células microgliales tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, en donde las células presentan una morfología más ramificada después de tratamiento con linalool, conservando el fenotipo más asociado con una acción anti-inflamatorio. El efecto de los monoterpenos sobre esta población celular ha sido observado en otros modelos como el tratamiento con paeoniflorin durante 4 semanas que disminuyó la densidad de la microglia en ratones tratados con IFN- α , además revirtió los comportamientos depresivos y los niveles anormales de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-1 β y TNF- α , IL-9, IL-10, IL-12 y MCP-1) en el suero y amígdala [23]

El tratamiento con el ácido 18 β -glicirretínico, un triterpeno mostró un efecto regulador sobre la microglia, disminuyendo significativamente el perfil pro inflamatorio en el SNC a través de la supresión de la vía de señalización MAPK, aliviando la desmielinización inducida por la inflamación y redujo la reactividad

microglial presente de manera generalizadas en las patologías neurodegenerativas [24].

Los cambios en el fenotipo de las células microgliales se han asociado con diferentes funciones, por ejemplo la morfología hipertrófica y activada de esta población celular ha sido descrita por tener un papel crucial en el aumento de las concentraciones extracelulares de L- glutamato (L-Glu) a través de la liberación de L-Glu por parte de esta población celular, respuesta que ocurre en conjunto con la activación de los astrocitos, donde los transportadores de L-Glu se regulan a la baja por la elevación de L-Glu intracelular provocando un aumento en el medio circundante, reacción crucial e iniciadora de la respuesta inflamatoria [25].

El daño neuronal presente en varias enfermedades neurodegenerativas puede producir la activación de la microglia a través de señales paracrinas y/o autocrinas permitiendo que su estado de activación continúe en el tiempo después la alteración inicial, siendo una fuente de producción de citoquinas y radicales libres constante, esta activación progresiva de las células microgliales permite la continuación de la propagación de señales de toxicidad generando resistencia a la resolución de la inflamación [26].

El fenotipo microglial asociado con su activación que contribuye a la patogénesis y su mediación ha sido estudiada en distintos terpenos con acción neuroprotectora, como es el caso de la glaucocalixina que está involucrada en la producción de mediadores pro inflamatorios por parte de la microglia después de ser estimulada con lipopolisacárido (LPS), esta molécula inhibió significativamente la producción de óxido nítrico, suprimió la expresión de COX-2 y medio los cambios morfológicos en la microglía. La producción de citoquinas pro inflamatorias tales como TNF- α , y las interleuquinas IL-1 β y la IL-6 fueron disminuidas, además suprimió la activación del factor nuclear NF κ B mediante el bloqueo de la degradación de I κ B- α [27].

La mediación de la activación de la microglia es un fenómeno que se relaciona directamente con la producción de citoquinas pro inflamatorias y de la regulación de factores de transcripción implicados que activan genes pro inflamatorio. Nuestros resultados muestran que la modulación de la microglia está también acompañada de una tendencia a la disminución de las citoquinas IL-1 β y la IL-6 principalmente en los sobrenadantes de los cultivos de microglia y con la modulación de factores de transcripción relacionados con la modulación de la respuesta inflamatoria como NF κ B. Resultados similares han sido observados dentro de los efectos de acción moduladora de los terpenoides. La artemisina, un sesquiterpeno usado principalmente para el tratamiento y la prevención de la malaria mostró su capacidad de inhibir la activación de NF- κ B y la producción de mediadores pro inflamatorios en la microglía estimulada con LPS, el compuesto inhibió significativamente la producción de TNF- α , IL-6, y óxido nítrico (NO). El bloqueo de la actividad de NF- κ B se dio por el aumento de los niveles de

proteína I κ B- α , que forma un complejo inactivo citoplásmico con el complejo heterodimérico p65-p50, sugiriendo que la artemisinina es capaz de inhibir la neuroinflamación al interferir con la señalización de NF- κ B [28].

Los resultados del presente estudio sugieren un papel protagónico de la microglia, sin embargo la respuesta de los astrocitos, fue sensible al terpeno, disminuyendo su hiperreactividad después de un mes de tratamiento con linalool intranasal, sumado a la disminución de COX-2, apoyado por los resultados *in vitro*, donde los astrocitos tratados con linalool exhibieron una significativa disminución en los marcadores pro-inflamatorios NF κ B, IL-1 β . Bien es sabido que estas dos poblaciones celulares trabajan en conjunto para mantener la homeostasis celular. La neuroinflamación es una respuesta multifacética que involucra varios tipos de células, perteneciente al SNC como a la circulación periférica. Los astrocitos y la microglía, se consideran actores claves para iniciar una respuesta inflamatoria después de una lesión. Los astrocitos incluyen una variedad de respuestas dentro de las que están la liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento, contribuyen en la formación de una cicatriz glial alrededor de las áreas lesionadas, fagocitando células en proceso de muerte y residuos celulares [29]. Por ello, es importante mencionar que el efecto del linalool sobre la microglia juega un papel crucial a la hora de responder frente al evento isquémico. Los astrocitos reactivos, pueden influir en las respuestas de otros tipos de células, tanto dentro del cerebro como a nivel sistémico. Se ha demostrado que las respuestas pleiotrópicas de las células gliales facilitan tanto la resolución de la inflamación como la exacerbación de la misma. Los astrocitos también desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad de BBB, formando los pies astrocíticos alrededor de las células endoteliales, manteniendo la comunicación inter e intracelular. La función de los astrocitos también puede depender de su capacidad para asumir diferentes morfologías y fenotipos, pues estudios realizados con estimulación con LPS muestran como los astrocitos lesionados por esta molécula asumieron fenotipos deletéreos [30], asociados a hipertrofia y pocas ramificaciones, efecto que fue prevenido por el Linalool intranasal en nuestro estudio.

Distribución subcelular del factor de transcripción Nrf2

Nuestros resultados muestran un cambio en el patrón de expresión del factor de transcripción Nrf2 particularmente en la población microglial tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo*, pasando de la agregación citoplasmática a un mes después de la isquemia y bajo el estímulo excitotóxico ocasionado por el glutamato; sin embargo, cambia a una distribución punteada en el citoplasma después del tratamiento con linalool y asociado con la recuperación neurológica de los animales isquémicos y a la supervivencia en el modelo *in vitro*. Esta distribución subcelular del factor de transcripción ya ha sido observada en otros estudios y se asocia con su función antioxidante y a la función mitocondrial para promover el control de la defensa antioxidante frente a eventos patológicos, por ejemplo

en cardiomiocitos se observó un aumento de los niveles de Nrf2 con un patrón de distribución mitocondrial como respuesta al estrés oxidativo [31]. La expresión de Nrf2 ha sido descrito como parte de fase dos de su actividad, denominada: fase citoprotectiva y de detoxificación, relacionada con el aumento y la actividad de las enzimas detoxificantes. Para regular la distribución subcelular y la activación de Nrf2 después de la inducción del evento oxidativo y modular la función transcripcional de las enzimas antioxidantes de la fase dos tardía, permitiendo una reprogramación adaptativa para la recuperación y aumento de la supervivencia frente al estrés oxidativo [32]. En otro estudio de revisión muestran que múltiples motivos sensibles a fenómenos redox (NES / NLS) juegan un papel importante en la localización nucleocitoplásmica de Nrf2 y sugieren que la proteína Nrf2 por sí misma podría ser capaz de comportarse como un sensor independiente de Keap1 en respuesta a sustancias electrofilas y oxidantes promoviendo la respuesta de defensa celular frente a dichos eventos [33]. En otro estudio, se presentan oscilaciones de frecuencia translocacional autónomas, que Nrf2 experimenta entre el citoplasma y el núcleo provocando una respuesta transcripcional citoprotectora, dichas oscilaciones son producidas por retroalimentación negativa que involucra pasos sucesivos de desfosforilación y fosforilación. En este estudio, Nrf2 se inactivó en el núcleo y se reactivó al regresar al citoplasma, mostrando que la regulación de la transcripción de los genes protectores ligados a la respuesta antioxidante se produce a través de la translocación citoplasmática de Nrf2 y vincula el manejo de la respuesta al estrés oxidativo y al aumento de la vigilancia citoplásmica [34].

El tratamiento con linalool también mostró resultados en la disminución del factor de transcripción NF- κ B. La función conjunta de NF- κ B y Nrf2 ha sido descrita previamente, ya que la ausencia de Nrf2 puede exacerbar la actividad de NF- κ B y aumentar la producción de citoquinas, mientras que NF- κ B puede modular la transcripción y actividad de Nrf2, con efectos tanto positivos como negativos en la expresión de los genes diana [35]. Teniendo en cuenta el papel clave que desempeñan estos factores de transcripción en la modulación de la respuesta inflamatoria y antioxidante fortalece a los terpenos como candidato a nuevas terapias. El efecto modulador de los terpenoides sobre estos factores y la modulación de la respuesta inflamatoria ha sido descrito previamente. Un extracto ginkgo biloba cuyo contenido de terpenoides corresponde a un 6% redujo significativamente la liberación de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α en células microgliales BV2 en un modelo de privación por glucosa, también reguló a la baja p-TAK1, p-I κ B α y p-IKK β subunidades relacionadas con el bloqueo de la activación de NF- κ B p65 y su translocación del citoplasma al núcleo en la microglia atenuando la respuesta inflamatoria, efecto logrado por reacción sinérgica entre los componentes del extracto natural [36]. El pretratamiento con el monoterpene carvacrol inhibió significativamente la activación de NF- κ B inducida por Fe²⁺, la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias y la

apoptosis celular protegiendo las células de neuroblastoma SH-SY5Y resultado de la supresión de las vías de señalización de MAPK / JNK-NF- κ B [37].

Además, el linalool podría ejercer una acción muy rápida en el cerebro a través de su administración intranasal, validando su aplicación como terapia de protección efectiva en ratas isquémicas, y su posible translación para el tratamiento del evento isquémico en humanos. Las características fisiológicas de la cavidad nasal hacen que sea un blanco muy prometedor para la entrega de medicamentos al cerebro a través de la administración de fármacos por vía intranasal, ya que una alta proporción del fármaco administrado en la cavidad nasal alcanzará el epitelio respiratorio a través de la permeabilidad de los capilares, permitiendo una rápida captación sistémica del fármaco; otra de las ventajas es la propiedad que tiene este sistema de administración de evadir barreras fisiológicas como la actividad metabólica y de eliminación de sustancias hepática evitando ser absorbidas en el torrente sanguíneo, y a nivel del sistema nervioso, se evita el paso por la barrera hematoencefálica para entrar en el cerebro. También hay evidencias en estudios en animales que sugieren un contacto directo desde la nariz al cerebro a través de los nervios trigémino y olfatorio [38]. La acción del linalool en el modelo *in vivo* podría explicarse por la rápida absorción de la molécula a través del epitelio olfatorio y su rápido acceso al cerebro. La administración intranasal muestra características farmacocinéticas prometedoras, por ejemplo la entrega del opioide fentanilo alcanzó un T_{max} de 13 min, que es mucho menor en comparación con otras formulaciones del fármaco logradas por diferentes vías de administración, además, tiene un efecto que logra verse en tiempos muy cortos de duración proporcionando un rápido inicio de la analgesia, a través de este método de administración [39]. La biodisponibilidad de las moléculas administradas por vía intranasal también mejora considerablemente en comparación con otros métodos de administración, la administración por vía intranasal de factor de crecimiento nervioso (NGF), aumenta 14 veces su biodisponibilidad a través de la vía intranasal demostrando la potenciación de la captación cerebral que puede tener una sustancia al ser administrada a través del mecanismo de entrega nariz-cerebro gracias a las ventajas del contacto de la vía olfativa con el sistema nervioso central [40].

En general los resultados de nuestra investigación muestran un enfoque novedoso, donde el linalool administrado diariamente por vía intranasal indujo un efecto neuroprotector después de la isquemia: disminuyó el volumen de infarto a las 24 horas y siete días después la afectación, moduló el fenotipo y la respuesta microglial, sumado a la disminución de marcadores asociados con inflamación, estos resultados apoyan la recuperación neurológica, motora y cognitiva después de la isquemia. La acción de la molécula fue observada también en los modelos *in vitro* disminuyendo los fenómenos excitotóxicos generados por el glutamato con la conjunta disminución y modulación de los

marcadores de inflamación, y la redistribución del factor de transcripción Nrf2 principalmente en la microglia. Nuestros hallazgos muestran claramente la recuperación generada por el tratamiento con linalool a través de su efecto neuroprotector con potencial modulación de la respuesta inflamatoria, resultados que en conjunto nos permite validar la administración intranasal de linalool como futura terapia que podría trasladarse como tratamiento para el accidente cerebrovascular en humanos.

Conclusiones

El tratamiento intranasal con linalool disminuye el volumen del infarto 24 horas y 7 días después de la isquemia, resultado que está relacionado con una mejora en la evaluación neurológica y motora durante los siete primeros días de evolución del evento isquémico.

Los astrocitos y la microglia tratados con linalool muestran una disminución significativa en el número de núcleos condensados, hay una disminución y modulación de los marcadores de inflamación y de oxidación después de un evento excitotóxico y de un evento isquémico.

Las células microgliales presentan tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo* una disminución del marcador de reactividad Iba-1 y un fenotipo más ramificado sugiriendo un papel preferencial de la molécula sobre esta población celular y su potencial modulación de la respuesta inflamatoria; además, hay una clara tendencia a la disminución de la concentración de citoquinas pro inflamatorias (IL-1 β e IL-6) en sobrenadantes de suero y de cultivos celulares de astrocitos y microglia.

Los animales isquémicos tratados con linalool mostraron un mejor rendimiento en la prueba de transferencia del laberinto acuático de Morris en comparación con los animales isquémicos sin tratamiento, este resultado evidencia el efecto del linalool sobre la función cognitiva después de la administración diaria intranasal.

El tratamiento con linalool mostró un patrón diferencial subcelular de expresión del factor Nrf2 en cultivos primarios de microglia y en tejidos cerebrales, sugiriendo un papel modulador de la respuesta antioxidante que está estrechamente relacionada con la disminución de la inflamación mediada por NF-kB.

Finalmente nuestros resultados muestran un potencial efecto neuroprotector del linalool por vía intranasal, validándolo como candidato terapéutico con potencial efecto anti inflamatorio y posible traslación a terapias para el accidente cerebrovascular en humanos.

Perspectivas

- Evaluar por medio de inmunofluorescencia si hay interacción entre el marcaje mitocondrial con el patrón de expresión subcelular del factor de transcripción Nrf2 para dilucidar el mecanismo de acción antioxidante.
- Realizar un experimento de reversión de la función del factor de transcripción Nrf2 para discernir si el efecto de recuperación observado se debe a la actividad del linalool sobre la vía de señalización regulada por este factor específicamente.
- Hacer ensayos de co cultivos microglia- neurona para evaluar como interviene la regulación de la microglia generada por el linalool sobre la función neuronal.
- Aumentar el número de muestras del ensayo de concentración de citoquinas en sobrenadantes y suero que permitan establecer la significancia del efecto de reducción generado por el tratamiento con linalool.
- Este trabajo se realizó evaluando la entrega de linalool por vía intranasal como posible terapia de administración trasladable al tratamiento en humanos, dado que se validó el efecto neuroprotector de la molécula, se hace muy interesante escalar a una siguiente fase de estudio de aplicación como terapia menos invasiva para el accidente cerebrovascular.
- La formulación de linalool utilizada en este estudio y su potencial efecto terapéutico puede proponerse como complemento para generar productos con aplicación farmacéutica o como soporte nutracéutico

Agradecimientos

A la Profe Patricia por su incondicional orientación y apoyo, por vivir esta tesis conmigo. Gracias Profe por todas las lecciones: las científicas y las para la vida; por ensañarme que todo es posible si se trabaja con esmero, que el aprendizaje es integral y que con disciplina y dedicación todo puede lograrse.

A mi familia: mis papas Martha y Julio Hernán, mis hermanos y mis tíos, por su apoyo infinito, por sus enseñanzas y sabias palabras, por darme siempre fuerza y motivos para continuar.

A la Profesora Johanna Vargas, mi cotutora y a los integrantes del comité tutorial: Profe Edison, Profe Marisol Y Profe Angélica Sabogal muchas gracias por todo el apoyo, por las críticas constructivas y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo

Al Grupo de Neurociencias de la Universidad de Antioquia, en especial Área de Neurobiología Celular y Molecular y a sus integrantes: Andrea, Rafa, Ana María, Javi, Juan Manuel, Juan Camilo, Paula.

A Tania Marquez, por su valiosa colaboración en el desarrollo de los experimentos *in vivo*, gracias por la paciencia.

Al Grupo de sustancias Bioactivas (GIBS) por la preparación de la formulación y el análisis de biodisponibilidad

A todos y cada uno de ustedes, las personas antes mencionadas, gracias por tanto, pero sobre todo por creer en mí.

Bibliografía

1. Innamorato NG, Rojo AI, Garcia-Yague AJ, Yamamoto M, de Ceballos ML, Cuadrado A. The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation. *J Immunol.* 2008;181:680–9.
2. Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. Lesional accumulation of CD163(+) macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res. Elsevier B.V.*; 2012;1461:102–10. A
3. Zhao Z, Faden AI, Loane DJ, Lipinski MM, Sabirzhanov B, Stoica BA. Neuroprotective effects of geranylgeranylacetone in experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:1897–908.
4. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: Opportunities for therapeutic intervention. *Brain. Behav. Immun.* 2012. p. 1191–201.
5. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Merlos M, Garzón-Niño J. Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. *Oncotarget* . 2016;7:55840–62.
6. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins: Getting in on the Akt. *Cell.* 2002. p. 293–303.
7. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 1992;23:1261–76.
8. Corasaniti MT, Maiuolo J, Maida S, Fratto V, Navarra M, Russo R, et al. Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007;151:518–29.
9. Koutroumanidou E, Kimbaris A, Kortsaris A, Bezirtzoglou E, Polissiou M, Charalabopoulos K, et al. Increased seizure latency and decreased severity of pentylenetetrazol-induced seizures in mice after essential oil administration. *Epilepsy Res Treat.* 2013;2013:532657.
10. Imenshahidi M, Qaredashi R, Hashemzaei M, Hosseinzadeh H. Inhibitory effect of *Berberis vulgaris* aqueous extract on acquisition and reinstatement effects of morphine in conditioned place preferences (CPP) in mice. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014;9.
11. Taylor RA, Sansing LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013.
12. Kaka G, Yaghoobi K, Davoodi S, Hosseini SR, Sadraie SH, Mansouri K. Assessment of the neuroprotective effects of *Lavandula angustifolia* extract on the contusive model of spinal cord injury in wistar rats. *Front Neurosci.* 2016;10:1–9.

13. Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gele P, Gautier S, Laprais M, et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:1341–6.
14. Jun H-J, Lee J-H, Kim J, Jia Y, Kim KH, Hwang KY, et al. Aromatic terpenoid linalool is an agonistic ligand for {PPAR α } that reduces plasma triglyceride levels and rewires the hepatic transcriptome and plasma metabolome. *J Lipid Res.* 2014;55:1098–110.
15. Manuscript A. *Lipids in Health and Disease* SERIES EDITOR. 2008;1–24.
16. Finkelstein J, Heemels MT, Shadan S, Weiss U. *Lipids in health and disease.* *Nature.* 2014;510:47.
17. Sabogal-Guáqueta AM, Posada-Duque R, Cortes NC, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. *Neuropharmacology.* 2018;135:555–71.
18. Yin Q, Shi X, Ding H, Dai X, Wan G, Qiao Y. Interactions of borneol with DPPC phospholipid membranes: A molecular dynamics simulation study. *Int J Mol Sci.* 2014;15:20365–81.
19. Ceschel GC, Maffei P, Moretti MDL, Demontis S, Peana AT. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of *Salvia desoleana* Atzei and Picci essential oil from topical formulations. *Int J Pharm.* 2000;195:171–7.
20. Milanos S, Elsharif SA, Janzen D, Buettner A, Villmann C. Metabolic Products of Linalool and Modulation of GABAA Receptors. *Front Chem.* 2017;5.
21. Bi CC, Wang AP, Chu YC, Liu S, Mu HJ, Liu WH, et al. Intranasal delivery of rotigotine to the brain with lactoferrin-modified PEG-PLGA nanoparticles for Parkinson's disease treatment. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:6547–59.
22. Aktories K, Cooper MD. NF- κ B in Health and Disease. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2011;349:265–8.
23. Li J, Huang S, Huang W, Wang W, Wen G, Gao L, et al. Paeoniflorin ameliorates interferon-alpha-induced neuroinflammation and depressive-like behaviors in mice. *Oncotarget.* 2017;
24. Zhou J, Cai W, Jin M, Xu J, Wang Y, Xiao Y, et al. 18B-Glycyrrhetic Acid Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Through Inhibition of Microglia Activation and Promotion of Remyelination. *Sci Rep. Nature Publishing Group;* 2015;5:1–12.
25. Takaki J, Fujimori K, Miura M, Suzuki T, Sekino Y, Sato K. L-glutamate

released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: The “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012;9:1.

26. Block ML, Hong J-S. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:1127–32.

27. Kim BW, Koppula S, Hong SS, Jeon SB, Kwon JH, Hwang BY, et al. Regulation of Microglia Activity by Glucocalyxin-A: Attenuation of Lipopolysaccharide-Stimulated Neuroinflammation through NF- κ B and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2013;8.

28. Zhu C, Xiong Z, Chen X, Peng F, Hu X, Chen Y, et al. Artemisinin attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses by inhibiting NF- κ B pathway in microglia cells. *PLoS One*. 2012;7:1–8.

29. Cekanaviciute E, Buckwalter MS. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*. 2016. p. 685–701.

30. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016;173:692–702.

31. Strom J, Xu B, Tian X, Chen QM. Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress. *FASEB J*. 2016;30:66–80.

32. Biswas C, Shah N, Muthu M, La P, Fernando AP, Sengupta S, et al. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses. *J Biol Chem*. 2014;289:26882–94.

33. Das BN, Kim YW, Keum YS. Mechanisms of Nrf2/keap1-dependent phase II cytoprotective and detoxifying gene expression and potential cellular targets of chemopreventive isothiocyanates. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013.

34. Xue M, Momiji H, Rabbani N, Barker G, Bretschneider T, Shmygol A, et al. Frequency Modulated Translocational Oscillations of Nrf2 Mediate the Antioxidant Response Element Cytoprotective Transcriptional Response. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:613–29.

35. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:621–6. 36. Zhou JM, Gu SS, Mei WH, Zhou J, Wang ZZ, Xiao W. Ginkgolides and bilobalide protect BV2 microglia cells against OGD/reoxygenation injury by inhibiting TLR2/4 signaling pathways. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21:1037–53.

37. Cui ZW, Xie ZX, Wang BF, Zhong ZH, Chen XY, Sun YH, et al. Carvacrol protects neuroblastoma SH-SY5Y cells against Fe²⁺-induced apoptosis by suppressing activation of MAPK/JNK-NF-κB signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;36:1426–36.
38. Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int. J. Pharm.* 2007. p. 1–24.
39. Dale O. Intranasal administration of opioids/fentanyl - Physiological and pharmacological aspects. *Eur J Pain Suppl* [Internet]. European Federation of International Association for the Study of Pain Chapters; 2010;4:187–90.
40. Vaka SRK, Sammeta SM, Day LB, Murthy SN. Delivery of nerve growth factor to brain via intranasal administration and enhancement of brain uptake. *J Pharm Sci.* 2009;98:3640–6.